

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平7-509470

第3部門第2区分

(43) 公表日 平成7年(1995)10月19日

(51) Int.Cl. ⁸ A 6 1 K 45/00 38/00	識別記号 A E D A D U	庁内整理番号 8415-4C 9455-4C	F I A 6 1 K 37/ 22 A D U
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 25 頁)			
(21)出願番号 (86) (22)出願日 (85)翻訳文提出日 (86)国際出願番号 (87)国際公開番号 (87)国際公開日 (31)優先権主張番号 (32)優先日 (33)優先権主張国	特願平6-504755 平成5年(1993)7月26日 平成7年(1995)1月24日 P C T / U S 9 3 / 0 7 0 2 3 W O 9 4 / 0 2 1 0 8 平成6年(1994)2月3日 9 1 7 , 7 1 6 1992年7月24日 米国 (U S)	(71)出願人 ザ・ジョーンズ・ホプキンス・ユニバーシ ティ アメリカ合衆国メリーランド州21205, バ ルティモア, ラットランド・アベニュー 720 (72)発明者 クハイダ, フランシス・ビー アメリカ合衆国メリーランド州21212, バ ルティモア, セント・アルバンズ・ウェイ 5409 (72)発明者 バスターナック, ゲイリー・アール アメリカ合衆国メリーランド州21210, バ ルティモア, エッジヴェール・ロード311 (74)代理人 弁理士 湯浅 恭三 (外6名)	
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 がんの治療に脂肪酸合成阻害剤を用いる方法

(57) 【要約】

予後の悪い癌において脂肪酸シンターゼ（合成酵素）（F A S）が、過剰発現されるが、正常組織においては、F A S 発現が少ししか確認されない。脂肪酸合成の阻害は癌細胞に選択的に毒性であるが、低F A S 活性の正常細胞は耐性である。本発明は、癌患者の腫瘍の細胞による脂肪酸合成を阻害し結果として疾病過程を停止する当該癌患者を治療する方法を提供する。

特許(内容に変更なし)
請求の範囲

1. 内因的に合成される脂防酸に依存性の動物腫瘍細胞の増殖を阻害する方法であって、脂防酸合成の阻害剤を腫瘍細胞の増殖を阻害するに足る量で当該腫瘍細胞に投与することを含む前記方法。
2. 1分当たり且つ1μモルタンパク質当たり少なくとも10fモルのアセチルCoAがアシルグリセリドに取り込まれるような脂防酸合成活性を示す動物腫瘍細胞の増殖を阻害する方法であって、脂防酸合成の阻害剤を腫瘍細胞の増殖を阻害するに足る量で腫瘍細胞に投与することを含む前記方法。
3. 脂防酸シンターゼ活性を示すタンパク質を発現する動物腫瘍細胞の増殖を阻害する方法であって、脂防酸合成の阻害剤を腫瘍細胞の増殖を阻害するに足る量で腫瘍細胞に投与することを含む前記方法。
4. 脂防酸シンターゼ活性を示すタンパク質を発現する腫瘍細胞を有する動物の腫瘍の増殖を改善する方法であって、治療有効量の脂防酸シンターゼ阻害剤を当該患者に投与することを含む前記方法。
5. 内因的に合成される脂防酸に依存性である癌細胞を含む腫瘍をもつ患者の腫瘍の増殖を改善する方法であって、脂防酸合成の阻害剤を当該患者に投与することを含み、この阻害剤の量は脂防酸の合成を阻害するのに足るものである、前記方法。
6. 内因的に合成される脂防酸に依存性である動物の腫瘍細胞を有する方法であって、脂防酸による脂防酸の合成を阻害するのに足る量の脂防酸合成阻害剤を当該患者に投与することを含み、この阻害剤の量は脂防酸の合成を阻害しないような量である、前記方法。
7. 前記患者が乳癌、脳腫瘍、肺癌、結腸癌、膵臓癌、及び前立腺癌からなる群から選択される癌を有する請求の範囲1～5項のいずれかに記載の方法。
8. 脂防酸シンターゼ活性を発現するタンパク質の発現を、
 - a. 前記患者から試料を得、
 - b. 当該試料中の前記タンパク質の量を決定する

CoAカルボキシルーゼ、クエン酸リターゼ及びリンゴ酸脱炭酸からなる群から選択される酵素の阻害剤である請求の範囲第1～6項のいずれかに記載の方法。

19. 脂防酸合成の阻害剤が脂防酸合成を阻害するK_iが10μM未満を示す請求の範囲第18項に記載の方法。
20. 脂防酸合成阻害剤が、1分当たり且つ200.000個の細胞当たり少なくとも10fモルのアセチルCoAを取り込むような脂防酸合成活性を示す細胞による脂防酸の増殖を阻害するIC₅₀が10μモル未満を示す請求の範囲第18項に記載の方法。
21. 酵素が脂防酸シンターゼ (FAS) である請求の範囲第18項に記載の方法。
22. 阻害剤がセルレニンである請求の範囲第21項に記載の方法。
23. 酵素がアセチルCoAカルボキシルーゼである請求の範囲第18項に記載の方法。
24. 阻害剤がー(チトラシルオキシ)ー2-プロパン酸 (TDP A) である請求の範囲第23項に記載の方法。
25. さらに、脂質合成の阻害剤を脂防酸合成の阻害剤と共に共に投与する請求の範囲第1～6項のいずれかに記載の方法。
26. 脂質合成の阻害剤がトリアシンC (Triacin C) である請求の範囲第22項に記載の方法。
27. 内因的に合成される脂防酸に依存性の動物腫瘍細胞の増殖を阻害する方法に使用するための脂防酸合成の阻害剤を含む、阻害剤の製造法であって、前記阻害剤を腫瘍細胞に当該腫瘍細胞の増殖を阻害するのに足る量で投与することを含む前記方法。
28. 1分当たり且つ1μタンパク質当たり少なくとも10fモルのアセチルCoAがアシルグリセリドに取り込まれるような脂防酸合成活性を示す動物腫瘍細胞の増殖を阻害する方法に使用するための脂防酸合成の阻害剤を含む、阻害剤の製造法であって、前記阻害剤を腫瘍細胞の増殖を阻害するのに足る量で前記動物に投与することを含む前記方法。

工程により決定する請求の範囲第3項又は4項のいずれかに記載の方法。

9. 前記試料が腫瘍細胞の試料である請求の範囲第8項に記載の方法。

10. 前記試料が前記患者からの生体試料である請求の範囲第8項に記載の方法。

11. 前記患者工種が「体積フロー」と前記タンパク質をコードするmRNAとの間のハイブリダイゼーションを検出することを含み、請求の範囲第8項に記載の方法。
12. 前記判定工程が、前記タンパク質を発現学的に結合する前記タンパク質と抗体との間の結合を検出することを含み、請求の範囲第8項に記載の方法。

13. 脂防酸シンターゼ活性を示す前記タンパク質が、leu ty f ser g ly a sn a s d v a l t h r a s d i l e s e f a s d a s d a r u o h e p r o l y e p r o p r o e l u i c a l a a s n g l y l y r v a l g l u l y a l o u o h e a r e l y r g l n c y o o アミノ酸配列を示すポリペプチドと免疫学的に交差反応性であるエヒトープをもつ請求の範囲第3項又は第4項に記載の方法。
14. 正常細胞の脂防酸シンターゼ発現を減少させる工程をさらに含む請求の範囲第1項～第6項のいずれかに記載の方法。
15. 脂防酸シンターゼ発現を減少させる工程が前記患者のカロリー摂取を減少させることを含む請求の範囲第14項に記載の方法。
16. 脂防酸シンターゼ発現を減少させる工程が異端脂防酸阻害剤又はアシルグリセリドを含む、阻害剤を前記患者に投与することを含む請求の範囲第14項に記載の方法。
17. 異端脂防酸阻害剤又はアシルグリセリドを含む阻害剤が前記患者に必須脂防酸を供給する請求の範囲第16項に記載の方法。
18. さらに、脂防酸合成の阻害剤が、脂防酸シンターゼ、アセチル

29. 脂防酸シンターゼ活性を示すタンパク質を発現する動物腫瘍細胞の増殖を阻害する方法に使用するための脂防酸合成の阻害剤を含む、阻害剤の製造法であって、脂防酸合成の阻害剤を腫瘍細胞の増殖を阻害するに足る量で前記動物に投与することを含む前記方法。

30. 脂防酸シンターゼ活性を示すタンパク質を発現する腫瘍細胞を有する患者の腫瘍の増殖を改善する方法に使用するための脂防酸合成の阻害剤を含む、阻害剤の製造法であって、治療有効量の脂防酸合成阻害剤を当該患者に投与することを含む前記方法。
31. 外因性の脂防酸を利用することがない、癌細胞を含む腫瘍をもつ患者の腫瘍の増殖を改善する方法に使用するための脂防酸合成の阻害剤を含む、阻害剤の製造法であって、脂防酸合成の阻害剤を腫瘍細胞に投与することを含み、この阻害剤の量は前記細胞による脂防酸の合成を阻害するのに足るものである、前記方法。
32. 外因性の脂防酸利用できない、癌細胞の腫瘍細胞を増やす方法に使用するための脂防酸合成の阻害剤を含む、阻害剤の製造法であって、脂防酸による脂防酸の増殖を阻害するのに足る量の脂防酸合成阻害剤を当該患者に投与することを含み、この阻害剤の量は前記動物を救済しないような量である、前記方法。
33. 前記患者が乳癌、脳腫瘍、肺癌、結腸癌、膵臓癌、及び前立腺癌からなる群から選択される癌を有する請求の範囲第27項～第31項のいずれかに記載の方法。
34. 脂防酸シンターゼ活性を発現するタンパク質の発現を、
 - a. 前記患者から試料を得、
 - b. 当該試料中の前記タンパク質の量を決定する
35. 前記試料が腫瘍細胞の試料である請求の範囲第34項に記載の方法。
36. 前記試料が前記患者からの生体試料である請求の範囲第34項

に記載の方法。

37. 前記決定工程が脂肪酸ブローブと前記タンパク質をコードするmRNAとの間のハイブリダイゼーションを検出することをさらに含む請求の範囲第34項に記載の方法。

38. 前記判定工程が、前記タンパク質を免疫学的に検出する前記タンパク質と抗体との間の結合を検出することをさらに含む請求の範囲第34項に記載の方法。

39. 脂肪酸シクターゼ活性を示す前記タンパク質が、Leu, Tyr, Ser, Gly, Asn, Asp, Val, Thr, Asp, Ile, Ser, Asp, Arg, Pro, Lys, Pro, Pro, Glu, Ile, Ala, Asn, Gly, Tyr, Val, Glu, Lys, Ile, Phe, Arg, Tyr, Glu, Cysのアミノ酸配列を有するポリペプチドと免疫学的に交差反応性であるエピソードをもつ請求の範囲第29項又は第30項に記載の方法。

40. 正常細胞の脂肪酸シクターゼ発現を減少させる工程をさらに含む請求の範囲第29項〜第32項のいずれかに記載の方法。

41. 脂肪酸シクターゼ発現を減少させる工程が前記患者のカロリー摂取を減少させることを含む請求の範囲第40項に記載の方法。

42. 脂肪酸シクターゼ発現を減少させる工程が長鎖遊離脂肪酸又はアシルグリセリドを含む脂質組成物を前記患者に投与することを含む請求の範囲第40項に記載の方法。

43. 長鎖遊離脂肪酸又はアシルグリセリドを含む脂質組成物が前記患者に必須脂肪酸を供給する請求の範囲第42項に記載の方法。

44. さらに、脂肪酸合成の阻害剤が、脂肪酸シクターゼ、アセチルCoAカルボキシラーゼ、クエン酸リラーゼ及びリノ酸酵素からなる群から選択される酵素の阻害剤である請求の範囲第29項〜第32項のいずれかに記載の方法。

45. 脂肪酸合成の阻害剤が脂肪酸合成を阻害するためのK_iが10

特許(内容に変更なし) 明 細 書

がんの治療に脂肪酸合成阻害剤を用いる方法

発明の背景

発明の分野

この発明はがんの化学療法分野に関する。とくに、この発明は腫瘍細胞に対して毒性があるか、またはその増殖を抑制する治療薬のがん患者への投与を意図する。

発明の概要

がん腫細胞の中には、生育が速く、該細胞を育する宿主に、短期的には劇しい危険をひき起さない腫瘍となるものもある。たとえば、胸立腫がんには、患者が死の原因で死んだ後に初めて検知されるほど進行の遅いものが多い。このようながん腫は知覚しなくても差支えない。他のがん腫は転移して、急速に生育し、患者の死をもたらす。この種の悪性の強いがん腫の生育を遅らせる処置法が望ましい。

現在の大部分のがん治療法は、細胞分裂を阻害する化学療法薬剤による治療、または、細胞分裂中のDNAを破壊する放射線治療法を含んでいる。しかし、これらの治療法は、治療の時点でたまたまDNAを分裂または合成している正常な細胞にも影響を与える。したがって、悪性腫瘍の細胞に作用することとくに目的とする別の治療法が必要である。

脂肪酸代謝

人体の脂肪酸合成経路は4種類の主要酵素：マロニル-CoAを合成する標的酵素であるアセチル-CoAカルボキシラーゼ；NADPHを生成するリンジ酸酵素；アセチル-CoAを合成するクエン酸リラーゼ；およびアセチル-CoAおよびマロニル-CoAからのNADPH一価性合成の最終となる脂肪酸シクターゼより成る。脂肪酸シクターゼの最終生成物は、他の生成物中に包含させるために、脂肪酸Aによる別の酵素誘導を必要とする遊離脂肪酸である。人体では、重要な脂肪酸合成は2つの部位：パルミチン酸が主生成物である肝臓 (R₀nc

μM未満を示す請求の範囲第44項に記載の方法。

46. 脂肪酸合成阻害剤が、1分あたり且つ200, 000個の細胞当たり少なくとも10⁶モルのマロニル-CoAを取り込むような脂肪酸合成阻害性を有する細胞による細胞増殖を阻害するIC₅₀が10⁶モル未満を示す請求の範囲第44項に記載の方法。

47. 酵素が脂肪酸シクターゼ (FAS) である請求の範囲第44項に記載の方法。

48. 阻害剤がセルレニンである請求の範囲第47項に記載の方法。

49. 酵素がアセチルCoAカルボキシラーゼである請求の範囲第44項に記載の方法。

50. 阻害剤が5- (テトラデシルオキシ) -2-オクタノ酸 (TOFA) である請求の範囲第49項に記載の方法。

51. さらに、脂質合成の阻害剤を脂肪酸合成の阻害剤と共に共同投与する請求の範囲第44項に記載の方法。

52. 脂質合成の阻害剤がトリアスリンC (Triacetic C) である請求の範囲第51項に記載の方法。

ari, Can. J. Biochem., 52: 221-230, 1974); およびCler-C, 脂肪酸が主である母乳期の乳腫 (Thompsonら, Pediatr. Res., 19: 139-143, 1985) で行うことができる。母乳期および胎児期の子宮内腫を除いて (Joyeuxら, J. Clin. Endocrinol. Metab., 70: 1319-1324, 1990)、外因性食物脂肪酸の摂取が肝臓や他の器官中の経路を減少させるので生理学的な重要性は少ない (Weilら, Biol. Chem. Hoppe-Seyler, 367: 905-912, 1986)。

肝臓内では、アセチル-CoAカルボキシラーゼ、リンジ酸酵素および脂肪酸シクターゼが、甲狀腺ホルモンおよびインスリンにより、転写活性化を経て、いっせいに誘起され、またグリカゲン (Goodridge, Fed. Proc., 45: 2399-2405, 1986) および脂肪酸代謝 (Blakerら, J. Nutr., 120: 1727-1729, 1990) によって抑制される。脂肪形成に大きな影響を有する1種のサトカイシンの腫瘍増殖因子アルファ (TNF) は研究している細胞の種類によって刺激、あるいは抑制的になる。TNFは、アセチル-CoAカルボキシラーゼおよび脂肪酸シクターゼタンパク質合成の低減によって、アジポサイト中の脂肪形成を著しく阻害するが、脂肪酸合成の増進酵素のアセチル-CoAカルボキシラーゼの主要プロセッサ活性は別であるシトクロームP-450を高めることによって、肝臓内を著しく誘起する。

ヒトの脂肪酸合成のうち1つの主要部位である母乳期の乳腫では脂肪酸合成がブロッカチン、エストラジオールおよびブロッカチンの支配下にある。妊娠期間中、ブロッカチンは乳腫の発達を促進させるミトゲンとして働き、付随的に、ブロッカチン受容体を減少させて、出産後の脂質および乳タンパク質の合成を阻止する。出産後には、エストラジオールおよびブロッカチンのレベル低下がブロッカチン受容体を増大させ、さらに脂肪形成酵素の増大および乳上皮細胞による乳タンパク質の生成を可能にする。

ヒトの胸腺がんにおける脂肪酸シクターゼ発現の調節が、ブロッカチンに誘起される遺伝子発現のモデルとして主に研究されている。ブロッカチンが上皮

m. Mol. ec. Biol., 43: 223-228, 1992)。概して、受
容体に陽性の細胞がん中の FAS の発現が大きな役割を担うと見られてきた。一方、
受容体に陰性の細胞は検討されなかった。

脂肪酸シグナールを発現が研究された二三のシステムでは、細胞または癌のがん
に対して、正しい脂質組成との関連は認められなかった。FAS 発現と予後と生
因疾患とを比べると唯一の研究では、脂肪酸シグナールを発現を、27 例の肺癌
がんにおけるその位置での腫瘍形成によって研究し、脂肪酸シグナールを mR NA
の増大と新しい形態学的分化との関連を見出したが、エスโตรゲンまたはプロゲ
ステロン受容体状態との関連はなかった (Chailionis et al., J. Natl. C
ancer Inst., 82: 602-608, 1990)。これらのデータ
から、細胞がん中の脂肪酸シグナールを発現は新しい形態学的分化と関連があり
したがって、恐らくあまり本能的ではない関係とも関連するであろうと推測された。
脂肪酸シグナールを mR NA の Northern ブロットイングによる 87 例の肺
の研究は脂肪酸シグナールを発現と若年層（更年期前の患者）との関連を認めたが
またしても、受容体状態との関連は見られなかった (Wacker et al., Antic
ancer Res., 10: 1549-1552, 1990)。いずれの

研究も、患者の臨床的検査は行わず、FAS 発現と無疾前胎死または患者の生を
通りとを比較するデータもなかった。臨床的検査なしには、FAS 発現と胎死の
類似性に関する推測のおける結論を導き出すことはできない。

これらの研究は、いくつかのセンターからの200例以上の胎死の死例とは異
しく異なり、無疾前生を喪うまたは胎死的な生を喪うの測定によって、肝をしく
ない子達と確実が確定していないタンパク質 (QA-519と呼称) の発現との
間の強い関連性を示している (Kunajda, N. Engl. J. Med. 321: 636-641, 1989; Shurba J. Am. J. Clin. Pathol. 95: 238-242, 1991; Corrigan J. Clin. Pathol. 96: 406, 1991; Coles Lab Invest. 68: 13A, 1992; Zierler J. Clin. Oncol. 14: 101-110, 1991)。

る腫瘍組織を行つるがん腫抗原の腫瘍の否しみを和らげる方法を提議する。免疫は、パイオプシー、切除またはニードル吸引のような方法で得た組織試料について、免疫組織化学、サイトゾル酵素免疫検定法もしくは放射免疫検定のような検定方法を用いて腫瘍抗原シグナールを検知するかまたは腫瘍抗原の直接測定によつて、直接腫瘍組織中で測定することがである。腫瘍による腫瘍抗原シグナールの発現は、酵素免疫検定または放射免疫検定のような検定法を用いて、ブラスマまたは体液中の腫瘍抗原シグナールを検知することによつて、間接的に測定することである。

他の意味では、この発明は、治療上有効量のFAS阻害剤の投与前および/または投与中に、正常細胞のFAS阻害活性を低下させることによつて、広範囲にわたつて、正常の（非野生型的）組織（たとえば正常に腫瘍抗原シグナールを産出する肝臓）を潜在的毒性から保護しながらがん腫抗原を泳渡する方法を提供する。この免疫抑制は、たとえばカリリ阻害の低減または他の有効な方法によつて行うことができる。

本発明者らは、胸部がんや肺のがん腫で発現するランバグ重（Q1A-519と

19を発売する雑誌があり、この特定タレント賞は、がん闘の戒告によって必要な啓蒙性であるように思われるが、通常の雑誌によってでは必ずし

ら必要ではない。脂肪酸シンターゼ活性を有することが認められた。本発明者らは

消防防じんマスク（FAS阻害剤）がO₂—51%を阻害する程度に達して毒性があることを発見した。これらの発見に基づいて、本発明者らは、消防防じんマスクを改良して、患者の呼吸の苦しみを軽減することによるがん患者

を治療することの発明の方法を開発した。この発明の方法は、FAS組織剤のような阻害剤による治療が脂肪腫シンターゼを阻害する細胞に選択的であるためによくに有利である。FASは、通常、正常細胞によっては阻害されず、したがって腫瘍細胞が阻害剤によって選択的に作用される誘導可能な酵素である。

図 1 は、胸部がん腫における Q A - 5] B 発現と生存率との相関を示す。

図 1 A は、胸腺がんにおける Q A-5 1 9 発現とアロゲスチロン受容体 (P R) との予後の相関を示す。

図 2 A は、前立腺がんにおける Q A-5 1 9 発現と無脈新生を繰り返すとの相関を示す。

第 2 B 図は、乳癌がん腫における Q A-5 1 9 発現と予後との相関を示す。

第 2 C 図は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による癌胚がん腫からの Q A-5 1 9 の段階的純化および純化の種々の段階におけるタンパク質の対応する W e s t e r n ブロットを示す。

第 3 A 図は、Q A-5 1 9 と免疫学的に交差反応を呈するペプチドの 3 4-アミノ酸配列を示す。この配列は、M a e d a, J., D i o l, C h e m., V o l, 2 6 0, P. 6 6 9 8-6 7 0 9, 1 9 8 5 によって報告された L D E 遺伝子によりコード化された最初の 3 4 のアミノ酸に相当する。

第 3 B 図は、Q A-5 1 9 のペプチド配列分析を示す。

第 4 図は、Q A-5 1 9 がアセチルアミンおよびニコリン C o A から脂肪酸を合成することを示す。

第 5 図は、セルレニンがん腫細胞の生育を阻害するが、正常の細胞に対しては生育を阻害しないことを示す。

第 7 図は、Q A-5 1 9 誘発活性が増すにつれて、セルレニンの阻害が向上することを示す。

第 8 図は、F A S 発現とアシルグリセリド合成との相関を示す。

第 9 図は、F A S は配列を有するリポアロゲスのその位置での複製形成による腫瘍細胞系における Q A-5 1 9 の発現の検知を示す。

第 1 0 図は、免疫組織化学的ステインによって検知された Q A-5 1 9 の選択的発現を示す。

第 1 1 A および B 図は、セルレニンの、種々の乳がん腫細胞系に対する相対的生育阻害を示す。

第 1 表 Q A-5 1 9 発現とがんの予後
(免疫組織化学による検定)

腫瘍 種類 例数	腫瘍群		備考
	70 (第 1 および 2 期)	予後との関連 生存率 3. 92 比較的危险	A
	135 (全期)	生存率 4. 85 比較的危险	Martins
	49 (第 1 および 2 期)	早期 (<2 年) 再発 アロゲスチロン受容体 との組合せ (p<0. 02)	B
前立腺	42 (全期)	腫瘍グレード (p<0. 006) 腫瘍容積 (p<0. 004)	C
結腸	27 (全期)	遠隔転移 (p<0. 02)	D
卵巣	34 (全期)	癌胚抗原 および生存率 (p<0. 005)	Kacinski

A. Kuhnoldら, N. Engl. J. Med. 321:534-41, 1989
B. Coteら, Mod. Pathol., 5:13A, 1992
C. Shurbaら, Am. J. Clin. Pathol., 97:589-691, 1992
D. Redstonら, Mod. Pathol., 5:47A, 1992
* 実験例 1 参照

本研究からは、Q A-5 1 9 を分離して、分離したタンパク質が脂肪酸シクラーゼ活性を示すことを確かめた。ヒトの胸腺のがん腫細胞系から純化した Q A-5 1 9 はラットの脂肪酸シクラーゼとペプチド配列が相同であり、Q A-5 1 9 は、

第 1 2 A および B 図は、セルレニンの濃度がアシルグリセリド合成阻害とは相関するが、コレステロール合成阻害とは相関しないことを示す。

第 1 3 図は、細胞増殖速度とセルレニン阻害に対する感受性とは相関がないことを示す。

第 1 4 図は、前立腺がん腫系に対するセルレニンの生育阻害を示す。

第 1 5 図は、高レベルの肉生的脂肪酸合成を伴う選択的乳がん腫系の T O P A による選択的生育阻害を示す。

第 1 6 図は、Q A-5 1 9 を発現する腫瘍細胞に対する T r a c e i n-C のおよびセルレニンの生育阻害効果を示す。

第 1 7 図は、外因的に添加された脂肪酸が F A S 阻害を抑えて、セルレニンの脂肪酸効果から細胞を解放することができることを示す。

第 1 表 腫瘍に阻害する新しい誘発活性の発見

本研究からは、第 3 A 図に示すペプチドには見られるが、ハプトグロビン 1 またはハプトグロビン 2 には見られないエビトープに特異的抗体と、とくに、免疫反応性があるタンパク質を発見し、また該タンパク質が、もともと癌性の検いがん腫と高度に相関することを発見した。このタンパク質は Q A-5 1 9 と命名され、またこの明確な Q A-5 1 9 とも呼ぶ。いろいろのがん腫系での生育阻害に関する研究は、癌腫の腫瘍またはアロゲスチロン中の Q A-5 1 9 の検知が不十分な予後とに統計的に高度の有意で相関することを示した。(第 1 表参照)

また脂肪酸シクラーゼの機能的特徴を有する。Q A-5 1 9 による脂肪酸合成は、脂肪酸中への C-マロニル補酵素 A の結合、短く脂肪酸のエステル化、および逆相転移クロマトグラフィーによる分析によって実証された。純粋 Q A-5 1 9 の特異活性は、アセチル補酵素 A およびマロニル補酵素 A の存在下で、3 4 0 n m における N A D P H の酸化に付随して、分光測光的に測定された。1 つの測定では、Q A-5 1 9 の特異活性は 5 8 6 ナノモル酸化 N A D P H /分/m g タンパク質と求められ、ヒトの肝臓からの F A S から得た 4 0 4 という値にかなり類似している。

脂肪酸シクラーゼは、肝臓および授乳期の乳腺を含む特定組織からの細胞のサイトゾール中に存在する大きなタンパク質であるが、F A S はほとんど正常 (非悪性) の成人の組織では発現しない。高等生物中の脂肪酸シクラーゼは、単一分子で下記 7 種類の酵素機能を行うことが広く知られている多官能酵素である (W a k i l, S. J., Biochemistry, 28:4523-4530, 1989)。

- アセチルコラシクラーゼ
- マロニルコラシクラーゼ
- ペーケトアシルシクラーゼ (結合酵素)
- ペーケヒドロキシシクラーゼ
- エノイルレグラーゼ
- チオエスチラーゼ

癌胚がん細胞は脂肪酸シクラーゼを発現することが知られているが、大部分の他の腫瘍細胞は、この酵素の有無について調べられていない。R o c h e f o r t および共同研究者は、癌胚がん細胞から F A S を部分クローン化して、癌胚がん細胞系による F A S 発現が、アロゲスチロンに対する反応性と相関性のあることを認めた (C h a i b o s s, J., Biol. Chem., 262:9823-9926, 1987)。この証拠に基づいて、彼等は、F A S を発現する細胞は、脱分化が少なく、したがってあまり癌性がない腫瘍からのものであると結論した (C h a i b o s s, J., Nat'l. Cancer Inst., 82:

602-506, 1990)。

本発明者らは、Rocchi *et al* の指示に従って、FAS 活性を示すサブストラットであるQA-519 の存在は、もっとも毒性があるがん腫と極めて相関性があることを発見した。

本発明者らは、癌増の体外培養阻害試験法を用いて、QA-519 の阻害剤ががん腫細胞の成長を阻害するが、正常のヒトの繊維芽細胞に対してはほとんど効果がないことを実証した。実際に、FAS 活性が極めて低い繊維芽細胞は、高レベルのQA-519 活性を有する胸腺がん腫細胞の80%以上の生育を阻害するFAS 阻害剤濃度に耐性がある。多数の胎胎、樹立腫、肺、膵臓および脾臓のがん腫細胞系ならびに正常の繊維芽細胞に關する研究から、QA-519 シンターゼ活性とFAS 阻害剤による生育阻止との相関性が確認されている。阻害剤の濃度とQA-519 阻害活性との関係は試験に供するあらゆる種類の腫瘍細胞に適用できる。したがって、もっとも毒性のがん腫中で著しく増殖する脂肪腺シンターゼ阻害剤阻害は、これら腫瘍中の細胞の成長を阻害することができる。

B. 脂肪腺合成阻害にまつく治療

この発明は、腫瘍が、内因的に合成された脂肪酸（細胞内で合成された脂肪酸）に依存する細胞を含有するがん腫患者の腫瘍の若しみを軽減する方法を提供する。該細胞は、通常、FAS 活性を有するサブストラットを増大させる。前記患者の腫瘍の若しみは、患者に脂肪腺合成または利用を妨げる1種類以上の阻害剤を投与することによって和らげることができる。該阻害剤は、FAS を発現する腫瘍細胞に対して毒性があり、組織による脂肪腺合成および利用の低減および/または該患者の生体液中のFAS 活性の低下をもたらす投与が腫瘍の若しみを軽減させる。

A. 治療活性の評価

この発明の方法は、高レベルの脂肪腺シンターゼを有するがん腫患者を治療するのに用いることができる。治療に適用可能な特異的ながん腫には、膀胱、喉頭腫、皮膚付腫瘍、胆管、子宮頸部内腫、子宮頸部外腫および腫、食道、上咽頭、中咽頭のがん腫または発芽細胞系がん腫、ならびに中皮腫がある。とくに、腎、子宮内腫、腎臓、肝臓および肺のがん腫または肺がんのみならず胆嚢腫もこ

定法は、組織またはガラス中のOA-519 の免疫検定である。

FAS の発現は、免疫組織化学、サイトゾール腫瘍免疫検定または放射免疫検定、抗体プローブとFAS 配列を有するmRNA 標的とのその位置での組織形成のような検定法を用い、もしくは腫瘍活性の直接測定によって、生検、切除またはニードル吸引のような方法によって得た腫瘍組織試料中で、直接測定することかである。腫瘍による脂肪腺シンターゼの発現は、適切な検定法を用いて、血液、尿、唾液、リンパ液、唾液、精液、唾液、またはとくにガラス中のFAS の好ましい検定法には、免疫検定または放射免疫検定法がある。

内因的に合成された脂肪酸に依存する細胞は、また、腫瘍を包囲する非新生生物組織中に見られるよりも高レベルにある脂肪腺合成経路の他の酵素を検知することによって検定することもできる。とくに、予例でもねほど高レベルのアセチルCoA カルボキシラーゼを有する細胞の検定は、この発明の要因するところである。これらの酵素の存在は、FAS について述べた利便の方法と同様な検定法で検定することができる。

内因的に合成された脂肪酸を必要とする細胞は、がん腫、とくにもっとも毒性のがん腫の中に広く分析されている。治療前にFAS の存在を推定することは好ましいけれども、腫瘍した腫瘍は、その腫瘍が必ずしも必要ではないことを認めている。脂肪腺合成の阻害剤、とくに、腫瘍の若しみの軽減をもたらすFAS 阻害剤によるがん腫患者の治療は、腫瘍中にFAS の存在を示す。この発明の方法によってがん腫患者をうまく治療できれば、別にFAS の検定は不必要となろう。FAS を発現させるために通常見出されるようながん腫のこのような実験的治療法も、この発明の要因する範囲内にある。

脂肪腺合成阻害剤は、他の化学療法薬と組合わせても有効である。現在処方されているがんの化学療法薬は、脂肪腺シンターゼ経路に対してとくに活性ではないので、FAS 阻害剤は、現在の抗がん剤、とくに他の同化または異化経路を標的とする代謝療法薬を補充する。

FAS 発現と脂肪腺合成経路の阻害剤の生育阻止効果とは該細胞の周期とは無関係

の発明によって治療可能である。腫瘍、肺腫および肝臓、樹立腫ならびに脾臓は、この治療を行うのにとくに適する種類の腫がんである。

この発明の方法は、FAS を発現するか、または内因性脂肪酸（細胞内で合成される）に依存する細胞を有する腫瘍の治療を導引している。該細胞による内因性脂肪腺合成は、細胞200, 000 個あたり部分、アミノグリセリド中に10%エンプセル（以下、1セルと訳すことがある）以上のアセチルCoA を産生させる速度で行わせるのが好ましい。肝臓しい患者は、QA-519 またはアセチルCoA カルボキシラーゼ（ACC）のような脂肪腺合成経路の他の酵素を抑制する細胞を含有する腫瘍と、腫瘍の正常な（たとえば非新生毒性）組織中に見られるレベルよりも高いレベルで育しているために、該患者を見分けることができる。該細胞は攻撃的な腫瘍細胞であって、生き残りの減少、転移の増大、臨床的増殖速度の増大および治療的な毒性予後をもたらす。

脂肪腺合成阻害剤に対する腫瘍細胞の感受性は、通常、FAS のレベルとともに増えず変化する。細胞200, 000 個あたり、部分20%エンプセル以上のアミノCoA を脂肪酸に包含させるFAS 活性レベルを発現する攻撃的な腫瘍細胞は、脂肪腺シンターゼ阻害剤に対して敏感であると考えることができる。多くの腫瘍細胞は内因性脂肪腺合成に著しく依存するので、低FAS 活性レベルは、脂肪腺シンターゼ阻害剤による治療の候補者として特定の腫瘍を除外する必要はない。

がん腫細胞中のFAS の存在は、活性検定またはスライム、抗FAS 抗体を用いる免疫検定、FAS mRNA を測定する倫理性検査を含む適切な方法によって検知することができる。とくに肝臓しいのは、Herf 遺伝子の遺伝子産物と免疫的に交互反応性があるが(Mead *et al*, J. Biol. Chem., Vol. 260, pp 6698-6709, 1985)、ヘアトグロビン1または2とは交互反応性がないサブストラットのQA-519 を存在させる検定法である。該検定法はInternational Patent Publication WO 90/08324 または米国特許出願第07/735, 522 号に教示されており、いずれも参考資料としてこの明細書に記載してある。もっとも肝臓しい検

係である。したがって、脂肪腺合成の阻害剤は、急速に増殖する腫瘍を標的とする化学療法薬と組合せると、とくに効果的であると期待することができる。もしくは、脂肪腺合成阻害剤は、治療する特定の腫瘍の細胞に対して有効であることが判明している抗腫瘍薬を基剤とする化学療法による治療を補充するために投与することができる。とくに、未検知ではあるが、極めて悪性の細胞の大部分の生育を防ぐために、他の薬剤を用いる治療計画とともに、脂肪腺合成阻害剤を用いることはこの発明の要因する範囲内にある。

一方、脂肪腺合成阻害剤が、抗体によって開始されるにせよ、または細胞活性の別の経路によって開始されるにせよ、該攻撃細胞によって細胞媒介細胞の細胞を生じさせる薬剤と組合せると有効であるとは考えられない(Bhak *et al*, 1983), Membrane Damage by Complement, J. Biol. Chem., 258, 737: 343: 372)。したがって、この発明は、細胞媒介攻撃細胞を活性化させる外因的に供給される薬剤の存在下における脂肪腺合成阻害剤の使用に關するものではない。

B. 脂肪腺合成経路の阻害

それ自身の内因的に合成された脂肪酸に依存するがん腫細胞はFAS を発現する。これは、FAS 阻害剤が成長を阻害するという事実ならびに外因的に供給された脂肪酸は、FAS 阻害剤から正常の細胞を保護することができるが、がん腫細胞は保護できないという事実によって証明される。このように、細胞による脂肪腺合成の阻止をがん腫の治療に用いることができる。

脂肪酸は通常（アセチルCoA、アミノCoA およびNADPH）を用い、脂肪腺シンターゼ（FAS）によって合成される。したがって、脂肪腺合成経路は、通常、4種類の酵素を含むと考えられる。FAS および基質を生成する3種類の酵素：アセチルCoA カルボキシラーゼ（ACC）、リンゴ酸脱水素およびクエン酸リナーゼ。ヘキソースとアミノ酸を分岐を経てNADPH を生成する酵素のような、細胞内に基質を送り込むことができる他の酵素も、脂肪腺合成速度に影響を及ぼし、したがって内因的に合成された脂肪酸に依存する細胞内で悪化となるかもしれない。これら酵素の発現または活性の阻害は内因的に合成さ

れた脂肪酸に依存するがん細胞の生育に影響を及ぼす。この発明によって、がん細胞による脂肪酸合成を阻害する適切な方法は、とくに、癌腫の4種類の腫瘍の活性の阻害剤を含めて、がん腫瘍の腫瘍の苦しみを軽減させるのに用いることができる。

F A Sの生成物は癌腫のC₁₁、C₁₂、脂肪酸、通常ベルミチートである。ベルミチン酸は、細胞の種々の脂質成分の要求を満たすために、さらに処理されなければならない。この明細書で使用する「脂質生成酸」という用語は脂肪酸合成または長く脂肪酸処理において現われ、脂肪酸含有脂質成分をつくる1工程または工程の組合せを指す。この下流の処理の第1工程は酵素（アシルCoAシンターゼ）によって触媒される脂肪酸と糖脂素Aとのカップリングによる脂肪酸の活性化である。

脂肪酸の下流の処理または利用における重要な段階の阻害は、細胞が内因性脂肪酸に依存するにせよ、また細胞外から供給される脂肪酸を利用するにせよ、細胞の機能を阻害すると予想することができ、したがって該下流工程の阻害剤は、内因性脂肪酸に依存する腫瘍細胞に対して、十分に阻害的でないかもしれない。しかしながら、該細胞に対する脂肪酸合成阻害剤の投与が、細胞を、阻害剤による下流の脂肪酸の処理および/または利用の阻害に対してより一層敏感にするように変更された。この相乗作用によって、脂質生成酸および/または利用における下流工程の1種類以上の阻害剤とともに脂肪酸合成阻害剤を投与することは、内因的に合成された脂肪酸に依存する腫瘍細胞に選択的に影響を及ぼす。好ましい組合せには、F A SまたはA C Cの阻害剤と組合せたアシルCoAシンターゼの阻害剤がある。

C. 脂肪酸合成の阻害剤

F A Sを発現する腫瘍が患者にあることがはっきりしたとき、またはがん患者の生理的液体中にQ A-519が発見された場合には、患者は、この発明の方法により、脂肪酸合成阻害剤を患者に投与することによって治療することができ、投与がこの発明の要因する範囲にいうにある阻害剤は、細胞による脂質生成または利用を明らかに阻害することが認められる化合物を含むことができる。

は混合物の成分阻害剤の濃度に影響されやすい。非悪性細胞およびQ A-519を発現する細胞に対する特定混合物の効果の比較による種々の成分濃度の最適化は、癌腫に適用性にとって決まってきた問題である。治療効果を達成に必要な種々の成分の用量は、癌腫の調剤法により、個々の成分の薬理学的考慮して求めることができる。

脂肪酸合成の阻害剤、または阻害剤の相乗的混合物は、治療する動物を死滅させると思われるレベルを下回るレベル（用量および治療期間に基づいて）を投与する。投与は生体器官を回復できないほどには傷めないレベルが、または、肝臓機能、腎臓機能、心臓機能、腎臓機能、尿生排泄機能、外分泌機能、筋骨格機能、または神経学的機能の恒久的低下をもたらさないレベルが好ましい。一方、若干の細胞を死滅させるが後に再生させる（例、子宮内癌細胞）レベルの阻害剤の投与は必ずしも除外されない。

アセチルCoAカルボキシラーゼおよびF A S結合の結合酵素は、たぶん阻害の候補者となろう。脂肪酸合成は、これらの酵素の阻害剤によって阻害または停止すると思われる。その結果は脂肪酸の欠陥になると現われ、それが細胞を死滅させるであろう。しかし、正常の細胞は補填する脂質を移入させることができるので、生き残ると思われる。アセチルCoAカルボキシラーゼは脂質合成を調節する中心である。F A S結合の結合酵素は、増進および機能の点から十分に確認され、その活性中心は、セルレニンのような脂質血症試薬の標的となる1種の正常なシステインオールを含む。

種々の化合物が、脂肪酸シンターゼ（F A S）を阻害することがわかっており、がん腫瘍の治療に適切なF A S阻害剤を選択することはこの分野の通常の技術者の熟練の範囲内にある。F A S阻害剤は、純粋酵素を用いて、脂肪酸シンターゼ活性を阻害する化合物の能力を試験することによって確認することができ、脂肪酸シンターゼ活性はN A D P Hの酸化に基づいて分光学的に測定するか、または標識アセチルまたはラジオリCoAの包囲を測定することにより放射能によって測定することができる（Dillman, Meithans, Enry, Ymori, 35:74-83）。適切なF A S阻害剤は、たとえば第2表に例示するものか

脂肪酸合成を阻害する化合物は、腫瘍細胞の生育を阻害するために使用することができ、いうまでもなく、患者に投与する化合物は悪性細胞および正常な（悪性でない）細胞のいずれにも等しく毒性があってはならない。この発明の方法に用いるのに好ましい阻害剤は増殖指数が高い阻害剤である（増殖指数とは正常な細胞に影響を及ぼす濃度対腫瘍細胞に影響を及ぼす濃度との比のことである）。治療指数の高い阻害剤は、1つは正常な細胞系細胞系のような非悪性系、および1つは高レベルのQ A-519を発現することによって増進しているがん腫瘍の2つの細胞系に及ぼす阻害剤の効果と比較することによって確認することができる。とくに、治療指数は、低レベルの、肝ましくは細胞200, 000個当たり毎分約10フェムトモル以下のアセチルCoAをアシルグリセリド中に包含させる脂肪酸合成活性を示すヒトの細胞系のような動物細胞の生育阻害を、高レベルの、肝ましくは細胞200, 000個当たり毎分約20フェムトモル以上、より好ましくは少なくとも約80フェムトモルのアシルCoAをアシルグリセリド中に包含させる脂肪酸合成活性を示すヒトのがん細胞の生育阻害と比較することによって求めることができる。好ましいレベルの脂肪酸合成活性を有する細胞は実験研究によって容易に得られ、公的に入手可能な細胞系の例は後記実施例7に示してある。成育阻害試験は、細胞増殖に知えた外因性脂肪酸、たとえばB S Aと細胞をつくらせたO, 5mMオレイン酸を存在させて行うのが好ましい。

阻害剤は、細胞の生育を50%だけ阻害するのに必要な濃度（I C₅₀またはI D₅₀）を特性とすることができ、たとえば高治療指数を有するF A S阻害剤は非悪性細胞に対するI C₅₀よりも低濃度（I C₅₀により測定して）でがん細胞の生育を阻害する。これらの2種類の細胞に対する効果が大きな差異を示す阻害剤はと好ましい。脂肪酸合成の好ましい阻害剤は、脂肪酸合成活性の高い細胞に対して、活性の低い細胞の場合に測定される阻害剤のI C₅₀よりも、少なくとも1/5倍以下、より好ましくは少なくとも1/10以下小さいI C₅₀を有する。

少なくとも1つの脂肪酸合成阻害剤と、脂肪酸合成経路に基質を供給する酵素かまたは脂肪酸の下流の処理および/または利用の処理となる酵素の少なくとも1つの阻害剤との相乗的混合物の投与によって腫瘍を治療する場合に、治療効果

ら選ぶことができる。

第2表 脂肪酸合成経路の酵素の代表的な阻害剤

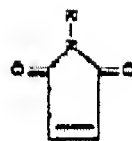
脂肪酸シンターゼの阻害剤

- 1. 3-ジプロモプロパノール
- E 111man試験[5, 5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸), D T N B]
- 4- (4'-クロロベンジルオキシ) ベンジルニコチン (K C D-282)
- 4- (4'-クロロベンジルオキシ) 安息香酸 (M II)
- 2 [S (4-クロロフェニル) ベンジル] オキシラジ-2-カルボキシレート (P O C A) およびそのCoA誘導体

- エトキシ糖キチン
- チオラクトンイジン
- セルレニン
- メラルソゾロール
- ヨードアセチン
- フェニルアルシノキシド
- ベンゾスチン
- メリチン
- メチルニコニコA
- 2,2-ヒドロキシアセチン

2. ヒドロキシアセチン

- (一) ヒドロキシアセチン
- (R, S) -S- (3, 4-ジカルボキシ-3-ヒドロキシ-3-メチル-2-チル) -CoA
- S-カルボキシレートメチル-CoA
- アセチルCoAカルボキシラーゼの阻害剤
- セトキシジン
- ハロキシホッフおよびそのCoAエステル
- ジクロロホッフおよびそのCoAエステル
- ラクトジン



R基のチールは、Morisakiら(Eur. J. Biochem. 211, 111 (1993))の報告によれば、多様に行うことができる。鎖長の長さを延ばしてもまた短くしても阻害効力は低下する。テトラヒドロセルレニン、セルレニンよりも80-150倍効力が小さい。この結果は、鎖鎖中のπ電子が結合において重要であるという考えと一致する。またトランス二重結合は、これも重要であるかもしれない配座の剛性を与える。

この発明の別の態様では、アセチルCoAカルボキシラーゼかまたはリゾ酸酵素かまたはクエン酸リラーゼを阻害する化合物を投与することによって、がん腫患者を治療する。これらの腫瘍の代表的な阻害剤を第2表に示す。特定の阻害剤選択の考察は前記のFAS阻害剤の場合と同様である。

アセチルCoAカルボキシラーゼの検定法は、この明細書に収録した米国特許第5,143,907号に教示されており、検定法は、熟練技術者が用いて、周知の手順でACC阻害剤の組成定数を求めることができる。



フルアジホップ



ジクロホップ



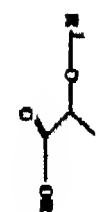
ジクロルアホップ

プロパノエート類のいくつかの同族体は良好な阻害剤である。1例はTOfA、5(テトラデシルオキシ)-2-アロ酸で、効力のあるアセチルCoAカルボキシラーゼ阻害剤である。構造を下記に示す。



この場合のC-2はキラルではない。R基は脂鎖状で炭素が14個の飽和鎖である。この発明によってこれも意図されるこの化合物および関連化合物は、この明細書に収録した米国特許第4,146,623号に教示されている。プロパノエート類の同族体の別の例はTOfAすなわちテトラデシルグリシド酸である。

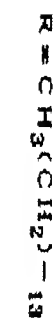
多細胞の生物からのアセチルCoAカルボキシラーゼを阻害するプロパノエート類は好ましい阻害剤である。該阻害剤は下記の環状構造によって表わすことができる。



Rは水素、アルキルまたはアリールであることができる。不斉炭素原子における配座はR、S、またはラセミであることができる。構造中のアセチルCoAカルボキシラーゼは、R異性体に特異的なことが多い。R'はアリールオキシアリールのことが多い。

A'-O-A'-

芳香族環はベンゼン、ピリジン等であることができる。芳香族環のハロおよび他の置換基はさし支えない。プロパノエート類の例を下記に示し、かつ/または第2表に挙げる。



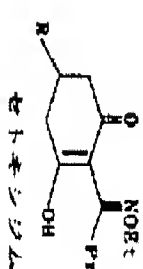
脂溶性およびエーテル性酸素に対してペータ位のカルボキシル基が共通した構造の特徴である。他の関連する2-置換プロパノエート類にはイソプロフェン、イソプロキサンおよびそれらの調製体のような化合物がある。



イソプロフェン

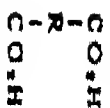
イソプロキサン

ケトシクロヘキセン類は別の種類のアセチルCoAカルボキシラーゼ阻害剤を表わす。1例はセトキシムである。



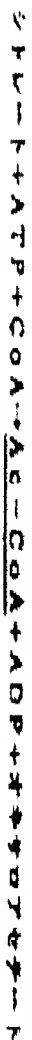
セトキシム

式中、Rはエチルチオプロピル基である。アセチルCoAカルボキシラーゼを阻害する別の種類の化合物は、下記一般式で表わされる。



アミノ酸およびペプチド二種のような特定例が第2表に挙げられている。

アセチルCoAカルキセラゼおよびFASのはかに他の種の特異性にはクエシエリターゼおよびリゾ脂酵素がある。これらの酵素は、脂質の生合成の場合に、FASを経てアセリターゼおよびNADPHを与える。代表的な反応は次の通りである。



リゾ脂酵素

アセチルCoAまたはNADPHの代謝は脂質生合成をも停止させると思われるので、脂質合成阻害剤はこれら阻害剤もまた基質にできるかもしれない。

脂質合成阻害剤の調査の中で、FASは細胞内でのみ脂質合成に作用するので阻害の好ましいターゲットであるのに反し、その他の3種類の酵素は他の細胞機能にも影響される。したがって、他の3種類の酵素の中の1つの阻害は正常な細胞にも影響を与えようである。しかし、これらの酵素の1つに対する阻害剤が前記のように高い脂質効果をもつことがわかれれば、その阻害剤はこの発明によって治療に用いることができる。脂質合成阻害剤は、投与の方法を選び、脂質合成阻害剤の脂質の阻害剤を投与して、治療が必要なときに、脂質の減少に達して、がん疾患を治療することができる。

この発明は、特定阻害剤が、高脂血症（たとえば、前記脂質合成物の一部として）で示されるように、脂質生合成に比較的特異的なものとなりうるものでなければ、米国特許第5,143,907号に開示されているホスファイトーボロシドまたはヨードアセトアミドのような、多種類の脂質酵素および経路を阻害阻害

ての細胞が、不飽和脂肪酸の存在のために、明らかに必要とする遺伝性酵素であるので、その阻害剤は単一抗がん剤として効果的に用いるには、毒性が強すぎる可能性がある。これに反し、アセリターゼCoAシントナーゼ阻害剤はセルレニン（特定脂質阻害剤）と組み合わせると脂質効果が増され、個々の薬剤を単一効果的なものにする。

D. 脂質合成阻害剤の投与

脂質合成阻害剤は、既述薬剤と組み合わされるキャリアーとを含有する薬剤組成物に処方するのが好ましい。脂質合成阻害剤は、他の成分が、合成阻害剤の活性を、治療に使用するほどには低下させない限り他の成分を含有することができる。製剤上許容されるキャリアーは周知であって脂質合成阻害剤の脂質合成阻害剤に与えるキャリアーを容易に選ぶことができる（RemingtonのPharmaceutical Science, Mack Publishing Co. Easton, PA, 1985）。

この発明はいずれかの阻害剤を含有する脂質合成阻害剤は、脂質合成阻害剤および脂質合成阻害剤によって決定される。投与量は既述して、約0.1μg/m²ないし約100μg/m²の血清濃度を得るようには選ばれる。初期の投与レベルは、治療効果を求めるのに用いられるような生体内モデルおよび生体内モデル、ならびに臨床試験において有効と思われる環境濃度を得る能力に基づき、治療法を個々の患者に適合させることおよび化学治療剤の環境濃度を定期的にモニターすることが必要である。特定患者への特定阻害剤の投与量および治療期間は、調製薬因に基づき、標準調剤法を用いる脂質合成阻害剤によって決定されることが出来る。治療に対する反応は、脂質合成阻害剤の血清または体液レベルの分析、脂質合成阻害剤のFAS活性もしくはQA-519レベルの測定

する阻害剤の使用を測定するものではない。

バルチレートは脂質合成阻害剤の主要生合成である。バルチレートの伸長および酸化は、必要な脂質の生成にとって重要であるかもしれない。このために、脂質合成阻害剤の伸長および酸化工程ならびに他の脂質合成工程はおそらく油酸の分子のターゲットとなる。内因的に合成された脂質阻害剤および外因性の脂質阻害剤はいずれも、脂質に包含させるためには、まずアセリターゼCoAシントナーゼによって活性化されなければならない。脂質合成阻害剤アセリターゼCoAは脂質合成阻害剤によって必須の代謝生成物であり、したがって、アセリターゼCoAシントナーゼは好ましい標的である。

Tomodaおよび共同研究者（Tomodaら, Biochem. Biophys. Acta, 921:595-598, 1987; Omuraら, J. Antibiotics, 39:1211-1218, 1986）は、Streptomycetes sp. SK-1894の生成物であるTriacsin C (WS-1228Aともいう）（天然のアセリターゼCoAシントナーゼ阻害剤）を説明している。Triacsin Cの化学構造は1-ヒドロキシ-3-（E, E, E-2', 4', 7'-トリメチルトリエニリジン）トリアゼンである。Triacsin Cはラットの肝臓のアセリターゼCoAシントナーゼを8.7μMで50%阻害し、脂質合成阻害剤のTriacsin Aは基質脂質合成阻害剤と結合する細胞によってアセリターゼ阻害剤のTriacsin Aを阻害する。アセリターゼ阻害剤の阻害は動物細胞にとって弱くなる。Tomodaら（Tomodaら, J. Biol. Chem., 266:4214-4219, 1991）は、Triacsin Cが1.0μMにおいて、Raji細胞の生質阻害をもたらし、またVeroおよびHEp-2細胞の生質阻害することも判明したと報告している。Tomodaらは、さらに、アセリターゼCoAシントナーゼが動物細胞に必須のものであること、および脂質合成阻害剤の阻害効果を有することを暗示している。

脂質合成阻害剤の阻害工程より成る。データは、2工程以上にわたる脂質生合成の阻害が相乗効果をもたらし、単一薬剤の必要な濃度および潜在的毒性をいずれも低下させるということを示している。アセリターゼCoAシントナーゼは、すべ

または患者の腫瘍の苦しみの軽減によってモニターすることが出来る。脂質合成阻害剤は、これらの測定によって明らかとなる治療に対する反応に基づいて投与量および治療期間を調整する。

E. 選択的治療法

好ましい治療法では、この発明の方法は、また、脂質合成阻害剤を用いて治療する患者の正常細胞を保護する。肝臓（正常に脂質合成阻害剤シントナーゼ活性を表現する）のような非新生物性正常細胞を潜在的毒性から保護するため、治療および/または治療中にFAS阻害剤および/または脂質合成阻害剤のレベルを低下させることができる。低下は、治療中に必須脂質合成阻害剤の供給、カロリー摂取の低下またはグルカゴン投与のような他の有効手段によって行うことができる。

FASは正常細胞内の誘導可能な酵素であるので、カロリー摂取の低下は正常細胞によるFASの誘導の減少をもたらす。もっとも脂質の脂質合成阻害剤は本質的にFAS（QA-519）を阻害する。カロリー摂取が阻害される患者の場合は、FASの発現が細胞細胞に阻まれ、FAS阻害剤の細胞毒効果を同時に限られる。FAS阻害剤の減少は、通常、阻害剤の投与および投与中に、脂質カロリー摂取を低減させることによって、脂質合成阻害剤と結びつけられる。

FAS阻害剤を減少させる別の適切な方法は、脂質合成阻害剤、肝臓は必須脂質合成阻害剤である。脂質合成阻害剤は、正常細胞の減少するFAS阻害剤をもたらす任意の方法で処方することができる。これは、脂質合成阻害剤、患者の食物中に含有するか、または脂質合成阻害剤と同じような脂質合成阻害剤中に処方するか、または他の適切な方法によることができる。

正常細胞内のFAS阻害剤を減少させるのに適切な食物は通常の脂質合成阻害剤の細胞内での容易である。脂質合成阻害剤が細胞細胞に対して毒性があると懸念されるレベルで、患者に存在している間に、正常細胞中のFASのレベルを低下させさえすれば、正常細胞によるFAS阻害剤を減少させる方法はこの発明の方法の要因する範囲にある。

実施例

以下の実施例は単に例示を目的として与えられる。実施例は上述の発明を制限

することを目的としたものではなく、それらは付属する臨床の範囲によってのみ限定される。

実験例 1

OA-519の発現は、乳癌の腫瘍における減少した生存率と前立腺癌と卵巣癌の腫瘍における減少した生存率と病気の無い生存率に密接に関連する。

茲に参考として引用する国際特許出願公開WO 90/08324又は米国特許出願番号07/735,522の実施例7は、乳癌におけるOA-519の発現が増加した病気の増悪と関連していたことを証明した。臨床学的研究は、OA-519の発現が前立腺癌と乳癌の腫瘍においては減少した全体の生存率と、卵巣癌の腫瘍においては病気の無い生存率と関連することを確証する。

乳癌の腫瘍

患者の人口：乳癌を持つ135人の婦人の追跡調査開始の任意団体の仲間(最初の外科的治療の時点で研究会に入会した患者)の身元がNotion Hospitalの腫瘍医によって確認された。此れら婦人の全額は主に浸透性の罹状の乳癌の腫瘍のために乳房切除の治療を受けた人々であった。患者の平均年齢は52歳で、それは32歳から72歳の範囲に亘った。平均の追跡調査期間は12.3年で、その範囲は10年から16年であった。患者は、外科手術後の治療の記録、死因、生存期間、主な腫瘍のバイオマーカーが各患者毎に利用できるようになった時に研究員に入手する権利を与えられた。エストロゲン(卵巣ホルモン)とプロゲステロン(黄体ホルモン)のリセプター(受容体)の情報は免疫組織化学的に決定された。更に、患者の年齢、商品の名前量と化学療法、放射線治療、及びホルモン療法が文書に記録された。浸透性の腫瘍と横形成型の腫瘍の等級が、同じくFisherらの判定基準を用いて決定された(Fisher他、Cancer, 46巻: 908~918頁, 1980年)。

OA-519に対する免疫組織化学的染色：

免疫組織化学的染色には、メリーランド州、ロックスビル、バークロンブライフ12301番地のAmerican Type Culture Collectionに1991年、7月26日にATCCアセスメス番号HB 10853の下に預託されたOA-51

9・M1又はHPR-2と名付けられたハイブリドーマ(融合細胞腫瘍組織)からのモノクローナル抗OA-519の抗体を使用した。

腫瘍に當ると、一次抗-OA-519のモノクローナル抗体を抗ペラフィンした組織の切片の上で2.5μl/mlの量で1時間、37℃で恒溫培養した。凍害用の調剤液の中で凍いだ後、次にスライドを1/400の塊(ラビット)の抗マウスの抗体(DAKO)の中で1時間恒溫培養した。別の凍害の塊、スライドをアビジンと結合したセイヨウワサビのペルオキシダーゼ(Vectastain ABCキット)を用いて1時間恒溫培養した。アビジン-ビオチンの複体が形成した後に、スライドをペラトキシリン末液の中で恒溫培養し、カバークラスを載せて顕微した。

OA-519の免疫反応性と陽性の判定基準：

陽性染色は細かい顆粒の細胞質で不均一異質なものであった。加えて、染色は腫瘍の100倍の倍率で可能であるか、又は陽性と採点される場合には腫瘍細胞の少なくとも10%で陽性付けするかの何れかでなければならなかった。

OA-519の免疫反応性の予後の重要性：

OA-519に対して陽性に染色された腫瘍の患者は、乳癌で死亡する著しく増加された危険を持っていた。図1はOA-519に陽性の患者と陰性の患者の運命を直す生命表である。例えば、12年後には、OA-519陽性の患者の大半を85%が死亡したのと比較してOA-519陰性の患者はもの約87%が死した。

次の表は段階的なOA-519反応性の重要性を示す：

	段階1		段階2		段階3	
	%死亡率		%死亡率		%死亡率	
OA-519+	9/13(70%)		27/37(87%)		9/9(100%)	
OA-519-	3/20(15%)		16/41(39%)		12/21(57%)	
P-値	0.002		<0.0001		0.019	

前立腺の腫瘍によるOA-519の発現

前立腺癌におけるOA-519の発現も同じく病気の再発と関連することが見い出された。前立腺癌と診断され、そのための治療を受けた患者が、Mountain

Home(バージニア州)のメデイカルセンターのフレイエルから選ばれた。研究集団には米国泌尿器科システム(AUS)の段階A~段階D1の前立腺癌の99人の患者が含まれていた。臨床段階の情報は腫瘍登録の要約または臨床記録の再調査から得られた。研究から除外された患者は、発症の時点で彼らが離れた部位に癌の転移(AUSの段階D2)を持っていたか、最後の追跡調査で彼らの状態が未知であったか、又は全追跡調査の期間が2年以下であった人々であった。

組織病理学の研究：

悪性腫瘍の等級付け：組織標本の全てを見直し、二つの支配的なパターンに対する数を加えることによってGleasonの得点を決定した(Gleason, Tannenbaum M(ed): Urologic Pathology: 前立腺。Philadelphia, 1988年、Lee & Febiger, 177~198頁)。段階IにはGleasonの得点は2~4、段階IIには5~7、段階IIIには8~10が割り当てられた。

免疫の組織化学的研究：

免疫組織化学的染色の為に各癌から代表的な組織のブロックを一つ選んだ。前立したOA-519に対してラビットの中に揚げられた親和力調整したポリクローナルの抗体を此の研究に使用した。日常的な方法で処理し、ホルマリンで固定し、パラフィンを包埋した組織に就いて染色を行った。標識を付けない一次抗体を利用したアビジン-ビオチン複体(ABC)の免疫ペルオキシダーゼの技法を使用した。簡単に當ると、内因性のペルオキシダーゼ活性の他に非特異的なプロテインの相互作用を遮断する為に、3%の過酸化水素を含む燐酸塩で遮断した生理的炭酸水(pH 7.2)の中で5%脱脂ミルクの中に、厚さ6mmの脱パラフィンし再水和した組織の切片を20分間培養した。次にスライドをPBS中で2.7μg/ml、pH 7.2、室温で1時間、親和力調整したポリクローナルの抗OA-519を用いて恒溫培養した。途中、PBSによる洗浄を介在させて、引き続いてPBSの中に1:200に希釈したビオチン化したマキの抗ラビットの免疫グロブリンとアビジン-セイヨウワサビのペルオキシダーゼ複体(Vectastain (登録商標名)、Vector Laboratories)を用いて、両方とも22℃で30分間、切片を恒溫培養した。Mayerのペラトキシリンによる対比染色と一緒にクロムゲン(巴腐体)とし

アミノエチルカルバゾール(ABC)(Vector Laboratories)を使用した。黄の対照として、各場合ともPBSを一次抗体の代りに用いた。各実験で正の対照として既知の抗OA-519のケースを使用した。

OA-519のエピトープ(抗原決定基)の場合は、若しも(1)免疫反応性が低い(100x)でも識別でき、(2)顆粒の細胞質染色が観察できるような核の染色無しに存在し、そして(3)染色が不均一(即ち、反応性の水準が各細胞毎に、又は領域毎に異なる)であったならば陽性として定義した。腫瘍は陽性または陰性として場点を評価した。OA-519に対する陽性の染色は、培養した99例の一次前立腺癌の56例(即ち、57%)に見られた。

平均の前追跡調査期間は4.17年(2.01~8.33年の範囲)であった。前

立腺癌は患者の19人(19%)に再発したか又は病気が進行した。病気の進行は、

“治療力のある”治療、例えば前立腺の完全切除または放射線治療などの就で腫瘍に発生した病気が転移した病気の出現、又はホルモン療法または期待的な治療法を用いて治療した患者の病気の段階の進行として定義された。病気の進行までの平均時間は2.54年(0.67~5.85年)であった。OA-519陽性のグループの中で15人の患者の症例(27%)があったのと比較してOA-519陰性のグループでは病気の進行は4人の患者の症例(8%)があった(図24-1に示されたKaplan-Meierのプロット)。進行した癌の比率におけるこれらのグループの間の相違は、統計学的に有意であった(Wilcoxonと対数ランクの試験(P<0.000))とFisherの確率試験(P<0.04))。OA-519は低い陽度と中間の陽度の前立腺癌の間では特に貴重な診断の指標であった。Gleasonの得点評価による組織学的な進行程度は有意な診断の指標ではなかった(データは示されない)。

卵巣癌

上記の乳癌の研究で用いられたのと同じ抗体、染色方法、標識を使用した卵巣癌のKacinskiらの研究が進行中である。しかしながら、今までに完了した34の患者の腫瘍の分析に基づくと、OA-519の発現は図2Bに示されるように病気の無い生存率と全体の生存率の減少と関連がある。

実験例 1 A：産菌を示す指標

OA-519の発現は、図1に示されるように初期の乳癌において強く産菌を示すものであった。此の産菌を示す可能性はエストロゲンとプロゲステロンのリセプターの変態を示す能力と無関係であった。ヒトの乳癌におけるOA-519の増殖した産菌は、癌腫の増殖または全体の生存率の何れかによって測られるように有意的に悪化した予知を与えた。段階1〜Ⅲの乳癌を持つ135例の癌腫の組織研究(Martino他、作成中の原稿)の中で、Coxの多変量の比肩した危険の分析はOA-519とプロゲステロン(黄体ホルモン)リセプターの発現が産菌とは無関係に逆の好ましくない生存率と強く、そして独立に関連していたことを実証した(一定量の相対的な危険度は表れられ4.880.0.070；多変量の相対的な危険度は表れられ2.567.0.153)。

OA-519産菌の育する産菌を示す能力は、更に付属するKaplan-Meierのプロット(図1と1A)によって例示される。図1は、OA-519産菌の癌者の約50%が15年間生存したのと比較してOA-519産菌の癌者の約10%が15年間生存したことを示す。図1Aは二つの独立の、産菌を示す指標、すなわちOA-519とプロゲステロンリセプターを組み合わせる時に、改良された癌腫表示の指標の増形成が得られることをグラフで示す。これはOA-519陽性、プロゲステロンリセプター陽性の高い危険度のグループ(88%が死亡)、OA-519陽性/プロゲステロンリセプター陽性の低い危険度のグループ(5.4%が死亡)及び中間程度の危険度のグループ(63%が死亡)に癌者を層形成することを確認にした。

此の研究に集められた他の癌腫の間では、OA-519はP185^{erbB}とカテプシンDの産菌とは無関係であった。興味あることに、OA-519の発現は癌腫後の抗腫の増殖による腫瘍細胞の増殖とは無関係であった。OA-519の発現と抗腫瘍計測法によって決定されるS-期面の割々の研究の中で、OA-519の発現は同じくまたS-期面のフラクシオンとは関連がないことを示した(Sbarbaj他、Lambert他、68：69A、1993年)。従って、OA-519の発現は癌者集団の層形成を改良する為に関連した指標、又は癌の任意の独立の、抗腫

ンを270.000グルトンのポリベプチドの存在に就いて分析した。ポリベプチドの存在は、臨意的には図3Aに示すベプチドに特徴的なポリクロローシの抗体または抗OA-519のタンパク質の何れかを用いてウエスタンブロッティングを使用し、プロットを¹²⁵I-タンパク質Aを用いて置換することによって確認することもできる。(図2CのレーンCにはグルコースから出たブールしたフラクシモンを含有した。)

Sephacrylカラムからの陽性のフラクシモンをブールし、導管側の精製用の緩衝液ブラス1mMのβ-メルカプトエタノールを用いて希釈し、次いで予備線断したMono-Q HR 5/5のアニオン交換高性凝縮体クロマトグラフィーのカラムの上に負荷した。1ml/分の流量でカラムを15mlの精製用の緩衝液ブラス1mMのβ-メルカプトエタノールを用いて洗出し、60分間に亘って細形の80mlの均配溶媒を用いて最終的に1MのKCl濃度に移出し、次いで1MのKClを含む精製用の緩衝液ブラス1mMのβ-メルカプトエタノールの5mlを用いて洗淨した。ポリベプチドを含むフラクシモンを、クローブリーリリシアントブールで染色した4%のブールを用いたSDS-PAGEによって測定した(図2CのレーンAにアニオン交換カラムから出たブールしたフラクシモンを含有した。)。OA-519と名付ける情報したポリベプチドを含むフラクシモンをブールし、下部の実験の必要性に従って更に処理した。クローブリーリリシアントブールで染色したSDSポリリリシアントブールによって測定した特徴的な収量は大きくばらばらで、約2×10³個当たり、OA-519の1μgであり、純度は98%又はそれ以上であった。

Bio-Rad MAPS分析用のHPLCカトリージを用いて90%以上の純度を得るために最終のハイドロキシアパタイトのクロマトグラフィーのステップを加えた。0〜600ミリの純度の均配溶媒を用いて、OA-519を200ミリの純度の均配溶媒における一つのピークに移出した。

精製したOA-519をpH8.0で50ミリのブールしたブールした重炭酸塩の中に透析し、グルタミン酸エチルプロテイナーゼC(V8プロテイナーゼ)の1：50の希釈率を用いて37℃で15分間タンパク質加水分解によって調製した。ベプ

テを示す指標を利用することからきただろう。

実験例 2：産菌の産菌率からOA-519タンパク質の増殖と部分的な配列

ヒト乳癌の細胞系から精製したOA-519は、配られた量のOA-519タンパク質の加水分解産物の電気ブロッティングとその後にはPVDP膜から直接にミクロ配列化することによって得られるOA-519からの内源ベプチドの配列(シーケンス)に基づくと、ミットの癌腫形成と相関性のベプチドのシーケンスを持つている。

OA-519を、図2Cに示すように2R-75.1のヒト乳癌の細胞系から精製した。図は癌腫の癌々の脱落で得られるタンパク質標準の4〜8%の均配を持つSDS-PAGE(ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドのブールの電気泳動)を示す。右半のペネルはクローブリーリリシアントブールを用いて染色し、左手のペネルは図3Aに示されるベプチドに抵抗して移けられた癌腫力増殖したポリクロローシの抗体を用いたウエスタンブロットである。

2R-75.1のヒト乳癌の細胞系培養液中で融合点近くまで癌腫成長させた。融合点層を細胞系で置換した生理的食塩水の中で置き、次に食塩水をこすり取り、遠心分離によって取離し、冷蔵保存した。

大凡を1.5×10⁶の細胞の各アトリコートサンブルに、10mlの精製用緩衝液(20mMのTris(ヒドロキシメチル)アミノメタンの塩)HCl, pH7.5(4℃)、1mMのジイソプロピルアルコール、0.1mMのフェニルメチルホルモニルアルオライド)を加した。細胞をダウンス(Dounce)のホモジザーの10ストロークを用いて均質化し、次に16.000gの重力加速で30分間、4℃で遠心分離することによって過剰な上清分液を得た(図2CのレーンCには過剰な2R-75.1の低い濃度の緩衝液(ライゼー)を含有した)。

Sephacryl S-200(Pharmacia)グルコースカラム(2.5×90cm)を、1mMのβ-メルカプトエタノールと100mMのKClを含むpH=8.0の精製用の緩衝液を用いて予備平衡化した。0.45mMの2R-75層細胞をブールして通過し、次にカラムの上に25ml/hの割合で添加した。4%のクローブリーリリシアントブールで染色したブールを用いてSDS-PAGEによってフラクシ

チドを4%のLaemmliブールの上でSDS-PAGEに掛け、PVDP膜(BioRad)に移し、Applied Biosystemsの電気的シーケンサーの上で自動化したエドマン分解を用いてPVDPから直に配列決定した(Metacode, P. T. "A Practical Guide To Protein and Peptide Purification for Micro-Sequencing", Academic Press, New York, 1989年)。

配定されたタンパク質加水分解の配列は大凡を150キロダルトンと134ダルトンの二つの主要なベプチドを発生した。150キロダルトンのベプチドは判別されたN-末端基を持ち、N-末端基のOA-519ベプチドを裏した。134キロダルトンのベプチドからもN-末端基の配列が得られたが、それは図3Bに示されるように13のアミノ酸に亘ってミットの癌腫形成と相関性の高い同族関係を示した。このように、OA-519は癌腫形成と相関性の高い同族関係をもち、分子量は270キロダルトンである。

実験例 3：OA-519は癌腫形成産物(シグターゼ)の活性を育する

2R-75.1のヒト乳癌の細胞系からの精製されたOA-519は、MAPHの存在で癌腫形成の中にアセチル胆碱素Aとアセチル胆碱素Aを組み合わせる(癌腫形成シグターゼ特異的な反応)ことに基づくと癌腫形成シグターゼ活性を育する(Wakui S. J., Biochemistry, 28:4523~4530)。此の反応は脂肪酸シグターゼ特異的である。OA-519による癌腫形成は、癌腫形成に¹⁴C-アセチル胆碱素Aを組み入れ、その後に癌腫形成をエスチル化し、逆相薄層クロマトグラフィーで分析することによって実証された。

OA-519による癌腫形成への¹⁴C-アセチル胆碱素Aの組み入れ:

プロテアーゼ阻害物質はシグターゼ特異的な最終ステップを妨害するのでそれらの阻害物質を省略した以外は、実験例2の場合と同じようにしてOA-519を精製した。20ミリのブールのTris HCl, 270ミリのブールのKCl, 1ミリのブールのEDTA、の20μl(25℃でpH7.5)の中のOA-519の4.2μgを下記のとおり混合液に添加して全容積を150μlにした：75ナノモルのNADPH；25ナノモルのアセチル胆碱素A；15.6μlの1モル濃度カリウム、pH6.6、25℃；97μlのHPLCグレードの水。反応混合物を薄層型の遠心分離機に降

け、5 μ l の 14 C マロニル補酵素 A (20 μ Ci/ml; 5 mCi/l) (ミリモル) と 25 マロニルの補酵素 A を添加した (C₁ はキエリー)。渦巻き遠心分離の後、反応混合物を 37℃ で 20 分間培養し、1:1 のクロロホルム: メタノールの 1 ml を添加して反応をストップした。

14 C 脂肪酸のメチルエステル化:

14 C 脂肪酸混合物を薄層クロマトグラフィによって分離する前に、 14 C 脂肪酸のメチルエステルをメタノール性溶媒の方法を用いて調製した。クロロホルム: メタノール: 反応混合物を渦巻き分離し、次いで 30 分間振拌した。遠心分離の後、上澄み液を N₂ の下で乾燥した。乾燥した脂質を 400 μ l の水和した n-ブタノール: HPLC グレードの水の混合物 (1:1) の中で二回抽出し、抽出液をブールし、洗浄し、N₂ の下で乾燥した。メチルエステルを合成するために、メタノール中の 2% 濃度の 0.75 ml を乾燥した脂肪酸に添加し、N₂ ガスを供給し、70℃ で 2 時間振盪放置した。HPLC グレードの水 0.75 ml を添加した液、 14 C 脂肪酸エステルを 1.5 ml のペンタンで二回抽出し、0.5 ml の HPLC の水で洗浄し、乾燥した。

14 C 脂肪酸のメチルエステルを分離し、逆相薄層クロマトグラフィを用いて次のようにして識別した。逆相薄層クロマトグラフィのプレート (20 x 20 cm, Analtech) を真空オーブン中で 80℃ で 20 分間ベークした。乾燥した 14 C 脂肪酸のメチルエステルと標準品を 20 μ l のクロロホルム: メタノール (9:1) の中に再溶解し、点線し、クロロホルム: メタノール: 水 (5:15:3) の中でクロマトグラフした。非放射性的標準をオートメーション 3000 を持つ Biorad System のイメージャーを用いて検出した。

処置: O A - 519 は 85% のバブルミチン酸エステル (培養液が 1 B 期の細胞脂肪酸)、大凡を 6% のミリスチン酸エステルと 8% のステアリン酸エステル (共に失われ培養液分子数が 14 と 18 の飽和脂肪酸エステルを合成した (図 4))。これらのデータは、O A - 519 が 14 C - ラベルしたマロニル補酵素 A から貴重な脂肪酸の発生を示すことにより脂肪酸のシンターゼ活性を有することを示す。製品脂肪酸の間の比率はヒト肝臓からの脂肪酸シンターゼと類似するが、しかしヒト

ニンは O A - 519 の脂肪酸シンターゼ活性の卓越合的な抑制剤 (阻害物質) となることが示された。

分光光度計による脂肪酸のシンターゼ検定:

脂肪酸シンターゼ検定を以下の成分を用いて全容積 451 μ l の中で行った: 実験例 2 に記述したように ZR - 75 - 1 の乳癌の細胞系統から調製した O A - 519 脂肪酸シンターゼ 18.88 μ g、25 マロニルのアセチル補酵素 A、75 マロニルの NADPH、50 μ l の 1 mM 濃度 カリウム、pH 6.6 (25℃)。高質マロニル補酵素 A を、0.9.9.148.198.又は 397 ミクロモルのセ ルレニンの存在で、0.5 ミクロモルと 0.6 ミクロモルの濃度で添加した。全ての検定では最終容積 451 μ l になるように HPLC グレードの水を添加した。

酵素、NADPH、アセチル補酵素 A、調整液、セルレニン、水を一層にし、渦巻遠心分離し、Beckman DU 650 の分光光度計の中で 37℃ で恒温放置した。バックグラウンドを決定するために基質を含まない試験に就いて 340 nm の波長領域で 2 分間に亘って NADPH の酸化をモニターした。次に反応キエペントにマロニル補酵素 A を添加し、混合し、37℃ で恒温放置したが、一方で分光光度計の中で 340 nm の波長領域で 10 秒間隔で合計 2 分間、NADPH の酸化を測定した。全ての測定は調整試料の中で行った。

検定: 分光光度計のデータは、与えられた各基質濃度における 1/V に対して Michaelis-Menten の方法 (Dixon M., Blockman J., 55:170 ~ 171, 1953) に従ってグラフにプロットした。図 5 の分析は、基質のマロニル補酵素 A の場合に 32 ミクロモルの見かけ速度定数 K_m を持つ O A - 519 脂肪酸シンターゼの反応をセルレニンが抑制することを示している。同じくまた抑制作用はセルレニンに対してこれまでに報告された限りでは非競合性であるように見える (Funahashi, 他. J. Biochem., 105:751 ~ 755, 1988)。グラフの曲線が傾度と交差するからである。

実験例 5: FAS の抑制剤の選択的効果

FAS (脂肪酸合成酵素) の抑制剤は脂肪酸細胞に対しては成長抑制の効果があるが、しかし正常の細胞に対してはその効果がない。O A - 519 は予後が望ま

乳癌の浸れからの脂肪酸シンターゼの場合のそれとは著しく異なる (浸れはステアリン酸エステルが 84%、バブルミチン酸エステルが 38%、ミリスチン酸エステルが 16%)。

O A - 519 脂肪酸シンターゼの動力学的特徴

抑制された O A - 519 の特異的な活性を、アセチル補酵素 A とマロニル補酵素 A の存在で 340 nm 波長領域の NADPH の酸化を追うことによって分光光度計で決定した。O A - 519 はサブバグ重 1 相当たり部分 NADPH の 58 マロニルを酸化する特異的な活性を有するが、この活性はヒト肝臓に就いて得られた 404 の値と有利に匹敵する。O A - 519 の分光光度計を用いた研究は、マロニル補酵素 A の場合の見かけの K_m = 86.2 x 10⁻⁴ M の値は 2.9 x 10⁻⁴ M よりも高く (Smith, 他. Methods Enzymol., 35:65 ~ 74, 1975: Dixon 他. Methods Enzymol., 35:74 ~ 83, 1976) X はヒト乳癌の細胞系統 SKBR3 の細胞系統に就いて報告された文献値 (1.8 x 10⁻⁴ M) よりも高いことを示した (Tompson 他. Biochem. Biophys. Acta, 662:125 ~ 130, 1981)。正常なヒトの組織から精製されたシンターゼの場合の K_m は報告されていない。K_m 値とは対照的に、62.4 nm の酸化された NADPH/分/μg シンバグ質の特異的な活性は、ヒト肝臓を含む種々の組織から精製された脂肪酸シンターゼに就いて報告された特異的な活性と類似していた (Rancieri, Methods Enzymol., 71:73 ~ 89, 1981)。

実験例 4: O A - 519 による脂肪酸の合成は FAS 阻害物質により抑制される
セルレニンは Funahashi 他. J. Biochem., 105:751 ~ 755, 1980 によって示されるように脂肪酸のシンターゼの酵素活性を有する特異的な抑制剤である。商品 melarsoprol は三価の砒素化合物であり、三価の砒素は調製するチオール基と反応する。脂肪酸のシンターゼ活性は劇的に減少されたチオール基を必要とするが、此のチオール基は melarsoprol による抑制のターゲットとして作用する。

分光光度計による酵素の検定で精製された O A - 519 を使用すると、セルレ

ニンは乳癌の腫瘍には過度に発現するが、しかし正常な組織には O A - 519 の発現は殆ど認められない。標準的な試験管内の成長抑制剤の検定法を使用して、O A - 519 の二つの抑制剤、すなわち、セルレニンとメルアルプロロールが脂肪癌の細胞に対しては抗・増殖性であるが、正常な繊維芽細胞には殆ど効果がないことが示された。

O A - 519 抑制剤に対して試験管内の成長抑制剤の検定が、ZR - 75 - 1 細胞または多数の集合体に成長した正常なヒトの繊維芽細胞を用いて行われた。次に、予め試験したウシの血清アルブミンに融合した 0.5 ミリモルのオレイン酸に生理学的水準で精製された新鮮な増殖 (10% のウシの胎児の血清を持つ RPMI) と調合し、増殖 (1:1) の融合増殖地の中に 25,000 個の細胞を平板培養 (プレート) した。細胞は一晚中自由に付着させ、成長させた。時間 0 では、下記の濃度: 50 μ g/ml から 0.01 μ g/ml まですりーズに段階的に 2 倍希釈した濃度 (これには薬剤を含まずベトリ目の高ちが型になった対照実験を含む) の連続を連続する為に 10% のウシ胎児の血清で RPMI 増殖地に希釈した濃度を添加した。各濃度は 4 個の同じもの (quadruplicate) の中で成長させられ、時間 0 は、4.8.24.48 時間とした。商品で処理した後に、細胞をクリスタルバイオレットで染色し、SDS (ドデシル硫酸ナトリウム) の塩) の中に可溶化し、570 nm の波長領域で分子吸光度の自動化されたプレート読み取り機の上で読み取った。

図 6 は、6.25 μ g/ml のセルレニン濃度で正常なヒトの繊維芽細胞は薬品の影響を受けなかったことを示し、48 時間迄には ZR - 75 - 1 細胞の成長はその 80% 以上が抑制されたことを示している。増殖の中に 0.5 ミリモルのオレイン酸の存在は、正常の繊維芽細胞の中でセルレニンの成長抑制を防止したが、しかし乳癌の腫瘍はいずれの中では防止しなかった。オレイン酸の増足の無い同じような実験では、乳癌の腫瘍と正常な繊維芽細胞の両方の成長は抑制された。

実験例 6: O A - 519 抑制剤の脂肪癌性は O A - 519 シンターゼの活性光量に阻害する

測定するほど小さい O A - 519 シンターゼ活性を持つ繊維芽細胞は、高水準の O A - 591 活性を持つ乳癌の腫瘍細胞の 80% 以上も成長を抑制するセルレ

OA-519 即時感シタターゼの活性

活性を維持するは—B Oで冷却した。

Н. Т. К. К. К.

Ｃに就いてカウソトした。

成長抑制剤の検定：各細胞系に対して、抗・増殖活性を實施例5の

維
也

15

セルライオン	由来	増殖	F A S 感性
SEB3	ヒ側頭, ER-	MDG ⁺ s+15aPCS	高 ⁺ 198.04
ZR-75-1	ヒ側頭, ER+	KPI1+100PCS	中 ⁺ 18.08
BCF-7	ヒ側頭, ER+	BREH+100PCS	中 ⁺ 31.27
BCF-7a	ヒ側頭	BREH+10%	低 ⁺ 18.32
BS-27	TFH777/37耐性 ヒ側頭 骨髄腔	PCS BREH+10%	低 ⁺ 13.87
SB-480	ヒ側頭	PCS Laibov11z+10%	低 ⁺ 7.93
LNCAP	ヒ側立腺 TFH777/37感性	PCS BREH+10%	高 ⁺ 700
TSU-prt	ヒ側立腺 TFH777/37感性	PCS BREH+10%	高 ⁺ 700
Duoro 1	ヒ側立腺 TFH777/37感性	PCS BREH+10%	中 ⁺ 400
DU-145	ヒ側立腺 TFH777/37感性	PCS BREH+10%	中 ⁺ 400
PC3	ヒ側立腺 TFH777/37感性	PCS BREH+10%	低 ⁺ 140

CONFIDENTIAL

シ線は添加せず、決定は24時間の点だけであつた。

は、0A・519 駆防衛シスターの合成過程を当てにしているように見える。

船の中のアシル・ナリセリドの立格と平行する

記述する実験の中で用ゐられた。

1.4に示しているカウンタした。特性度を調整するためには全部の調整タンバク質に対し

と云ふのである。

された主張なアスルーツリセリドであった。

各職員のトリグリセリドまたはホスフチジルエタノールアミンとともにホスフ

チシルコリン中に取り込まれたことをTLC分析が示したことである。¹⁴C-細胞コレスチロールエステル、遊離の膽固醇、またはホスファチシルセリンは全く検出されなかった。これらのデータは、(a)増加したFAS活性が増加した全体の脂肪助成生成を示唆すること、(b)主要な脂質であるホスファチシルコリンがFASの主な最終産物であること、ならびに(c)正常細胞ではFASと同様に制御されているアセチルCoAカルボキシルーゼおよびリシン3脂質の活性もまたこれらの細胞中で増加しているかも知れないこと、を意味する。

実験例8：インサイチュバイグライセイションにより分析されるOA-519の発現

2R-75-1ライブラリーからのcDNAは1.6kbのプロンプ、pFAS1.6を生じたが、該プロンプはラット脂肪シクターゼのcDNAの3'配列と85%の相同性を示した。2R-75-1の全RNAのノーザンブロットにおいて、このプロンプは単一の約9.5kbのメッセージとバイグライズした(データは示さず)。Bluescript II中のpFAS1.6に由来するジギキシゲニン増殖リボプロンプを用いた、ホルマリン固定されてパラフインに埋め込まれた2R-75-1およびDU-4475中のOA-519に関するインサイチュバイグライセイションを図9に示す。左のパネルはアジセシスを、そして右のパネルはセンスの対照を示す。pFAS1.6により生じたアジセシスリボプロンプは、DU-4475細胞よりも2R-75-1細胞に対してより実質的に強いバイグライズメッセージを生じた(図9)ことから、メッセージレベルと蛋白質レベルは一致したことが示された。即ち、OA-519を発現する細胞は、免疫組織化学またはインサイチュバイグライズメッセージのいずれかにより検出可能である。

これらのデータは共に、OA-519の過剰発現が増加したメッセージレベルによるものであり、転写活性化の増加またはメッセージ安定性が延期されたことに起因することを示唆している。増加したOA-519レベルはOA-519蛋白質の半減期の延期によるものではないらしいが、それはOA-519蛋白質の過剰発現がOA-519メッセージの過剰発現と伴っていないからである。同様

に、OA-519の発現が極めて異なるセルラインのサブプロットにおける、pFAS1.6バイグライズメッセージシグナルと同等なシグナルを発見するための実験により、過剰発現が遺伝子増幅によるものではないことが示された。

実験例9：ヒト乳癌におけるOA-519の過剰発現

図10は、侵入性(infiltrating)腺癌(ductal carcinoma)のホルマリン固定されてパラフインに埋め込まれた切片上における、アジニチンにより増強された抗-天然OA-519ラザイボリクローナル抗体を用いた免疫組織化学染色を示す。OA-519は、シタミノベンジジンを色原体として用いる標準ビオチン-ビジン免疫組織化学を用いて検出された。FASの発現の特異性を図10に示す。侵入性乳癌細胞のサイトプラズムは抗-OA-519抗体に強く反応したが、組織学的に正常な細胞の上皮および間質細胞の染線は反応しなかった。癌細胞のサイトプラズムにおける強い茶色の染色はOA-519の発現を示すが、正常な乳腺および小葉(矢印)および細胞間質は陰性であった。癌と正常細胞の間の脂肪シクターゼの発現の違いは、インビトロにおけるFASの遺伝的阻害の基盤を形成する。

FASの特異的阻害剤

以下の実験例は、癌細胞へのセルレニンの作用を示す。セルレニン、即ち脂肪シクターゼの特異的かつ非競争的阻害剤は、癌細胞において脂肪シクターゼの代表的阻害剤として研究された。セルレニンは脂肪シクターゼの過剰産生の活性部位中のチオール基に共有結合して、脂質の重要な酵素的工事を不活性化する(Funabashi, et al., J. Biochem., 105, 751-755, 1989)。癌細胞系反応、即ちアセチルCoAまたは初期の脂肪酸合成によりアセチルCoAの過剰を触媒してCO₂を生じる反応は、該シクターゼの最も特異的な反応であり、他の酵素により切断されない。セルレニンは他の活性を有することが記されてきたが、それらは、ヒトの脂肪とは無関係なモデル微生物において生じるか(例えば、カビのニルスチロール合成阻害、Omura (1976), Bacteriol. Rev., 40:681-697; またはウイルス中のRNA合成の低下、Perez, et al., (1991), F

EDS. 280:129-133)、実質的に高い濃度範囲において生じるか

(5μg/mlにおけるウイルスHIVプロテアーゼの阻害、Morelino, et al., (1990), FEBS. 281:373-377)、または内因性脂肪シクターゼの阻害の直接の結果でありうる(βリジンaseおよびαクロマージにおける抗凝固加工の阻害、Faiola, et al., (1987), J. Immunol., 139:3918-3923)。最近のデータから、セルレニンは蛋白質のミリスチン化(myristoylation)を特異的に阻害しないことが示唆された(Simon, et al., J. Biol. Chem., 267:3922-3931, 1992)。本発明において用いられた濃度においては、以下に示すとおり、セルレニンは顕著なFAS活性を発現するヒト癌細胞に関する特異的阻害剤である。

実験例10：セルレニンの細胞毒性は癌セルラインおよびヒト癌芽細胞におけるアシルグリセリド合成と平行する

セルレニンの細胞毒性は2つの異なる酵素アッセイにおいて研究された。第一は、クロニン阻性(限定希釈)分析により、セルレニンが細胞毒性であるか、細胞増殖抑制性であるか、または特異的な作用をもたないかを試験した。ひとたび細胞毒性が確立されると、バイスループラット96ウェルマイクロタイタート分所を用いて、養分のほとんどのセルラインのさまざまな濃度範囲に曝して試験した。癌細胞が内因性脂肪助成の生合成によるならば、セルレニンの毒性は脂肪助成の生合成レベルと正比例するべきであり、即ち、高いレベルのFASを伴う細胞はセルレニンに曝してより濃度が高くなるべきである。

クロニン阻性分析

100万の細胞を25cm平方のフラスコにプレートした。一晩インキュベートした後、細胞は未処理にするかまたは2.5.5.0または10.0μg/mlのセルレニンを6時間処理した。次に、トリプシン処理して単一細胞懸濁液にして、16mmデキシメに、1デイキシムあたり1000または500細胞になるように3とおりのプレートした。2R-75-1細胞およびMCF-7細胞に関しては3日間のインキュベーション後、そしてSKBR3細胞に関しては7日後、

コロニーを数え、未処理対照に対するパーセンテージとして表した。

図11Aに示すとおり、クロニン阻性分析において10μg/mlのセルレニンを処理したMCF-7細胞は癌芽細胞増殖毒性を示した。10μg/mlにおいて癌芽細胞を24時間に増加させると、310%以上の細胞死をもたらした。即ち、セルレニンは内因性脂肪助成を阻害したセルラインに対して細胞毒性であった。増殖阻害の測定：セルラインをウエルあたり5,000細胞にして96ウェルマイクロタイタートプレートした。18時間の増殖後、セルレニン(10%のDMSOに希釈)を培養に加えて10μg/mlとした。各時間点において空のウエル対照と共に4とおりの実施した。セルレニンへの24時間の曝露後、細胞はクリスタルバイオレットで染色し、1%SDSに溶解し、そして分子診断自動化プレートリーダー上で570nmにおいて結果を読んだ。エラーのパーセントの標準誤差を示す。

アイトロクタイタートプレート細胞毒性分析から、図11Bは、10μg/mlセルレニンへの24時間の曝露後、すべての6セルラインにおいて相対的な増殖阻害が予め測定された脂肪助成生成の濃度に直接関連していたことを示した。MCF-7アイトロクタイタート細胞はセルライン(MCF-7a)は唯一の顕著な例外であった。FAS活性に依する増殖阻害のグラフは、同様な結果を示した(実験例8および7を参照されたい)。即ち、セルラインに対する増殖阻害は内因性脂肪助成生成またはFAS活性のレベルにより大規模に予測できた。重要なことは、このことが癌細胞にも正常な胚細胞芽細胞にもあてはまることである。したがって、セルレニン増殖阻害と脂肪助成生成の関係は形質転換細胞における例外的特徴ではなかった。

実験例11：セルレニン(Cerulein)は¹⁴C-酢酸のアシルグリセリドへの取り込みを用意依存的に阻害するが、コレスチロール合成はセルレニンによって一直して阻害されるわけではない

アシルグリセリドおよびコレスチロールへの内因性脂肪助成の取り込み
各細胞用量に対する非毒性および毒性脂質分析のために、各細胞細胞に200.

図 I-2 は、この二つの細胞系においてセルレニンによって用置換された、個体的にかつ有数に阻害されたことを示す。これとは異に、図 I-2 は、コレスチロール合成は、わずかに阻害される MCF-7 細胞から阻害される SKBR3 細胞まで、影響の度合いは不規則にかつ極めてであることを示す。これらのチータは、セルレニンはコレスチロール合成の阻害に直接に影響を与えているのではないことを示唆する。さらに、これらの細胞系におけるコレスチロール合成の基盤レベルと、セルレニンの増殖阻害との間には相関性がなかった（チータは示さない）。従って、セルレニンは細胞系および細胞株細胞においてコレスチロール合成に直接なまたは個体的な影響を与えることなくチータセリド合成を阻害した。

有糸分裂指数 (Kuhajda, Benoit, Med., 321: 636-641, 1988)、増殖性細胞指数 (PCNA) の測定 (ザーブは手書き) またはフローサイトメリーによる細胞周期と FAS 増殖との相関 (Shu, Bui, Lab. Invest., 68: 69A, 1993) によって測定されるように、臨床的乳癌およびいくつかの細胞系における OAA-519⁺ 細胞は増殖には依存しないので、セルシニンの抗増殖活性は腫瘍細胞の増殖とは相関しないと考えられる。ミクロサイトプレートを用いて、5 つの細胞系の増殖時間を測定し、セルシニン増殖阻害 (10 μg/ml) と比較した。腫瘍細胞の増加時間とセルシニン増殖阻害または FAS 阻害とは相関しなかった (図 13)

TOFA (テセチルCOAカルボキシルーゼの阻害剤: Halvorsen, D. L. and McCune, S. A., *Lipids* 19: 351-356, 1984) に48時間暴露したところ、SK BR-3、ZR-75-1、SW480およびHS27細胞株は、それぞれ44.4、7.59、8.0、8および4.6μg/mlのID50で成長が阻害された。図15に示されるように、TOFA (5-チオチラチルオキシル-2-アロソニ酸) は、より低いレベルのFA5活性を発現する細胞株 (HS27およびSK-BR-3) よりも、高いFA5の細胞株 (ZR-75-1およびSW480) で成長阻害に対してより効力が高かった。

これらの実験においては、細胞をカエルあたり5000細胞で96ウェルマイクロタイタープレートに接種し、10%熱不活性化のシシ助芽胚液を含むRPMI-1640中で72時間維持した。次に、表4に示される化合物を加え、細胞をさらに48時間インキュベートした。次に、クリスタルバイオレット法を用いて成長阻害を測定した。

これらのデータを総合すると、セルシニシならびに防衛防衛台成の他の結果の阻害剤が、乳閉、結核および肺立腺の腫瘍細胞株の成長をよく阻害することを示している。さらに、成長阻害の効力は、これらの培養細胞により表される能防腺生合との相対レベルに比例した。

比較的高い（表3）についてもセルレニンの低地帯特性の増進を行った。TSU—PR1およびDUDERO—I増産系を10%フシ酸処理液を含むRPMI-1640中にT267ラヌコあたり、それぞれ 3×10^8 および 1×10^8 細胞づつ、95%エアー：5%CO₂の加湿雰囲気下においてブレートした。24時間後、初めのブレートインク濃度を測定した。さらに、2重の培養液に増産を交換するか（コントロール）、または、セルレニンを2.5—10μg/ml加えた。48時間後、細胞をトリプシン処理し、生きた細胞数を数え（トリアンブルー以外のも）をカウントした。得知した細胞の値を足算もった。どちらの増産系も、セルレニン（3—4μg/ml）に48時間さらすと、未処置の培養液と比較して倍知した細胞数が50%に増加された。図14は、2つの独立した実験のうち1つの代表的なデータを示す。

康 强 健

TOFA (アセチルCoAカルボキシルーゼの阻害剤) もまた、種々のレベルのFAS 酵素活性 (表3に示される) および脂肪酸合成 (図8に示される) を有する細胞株のパネルに対する抗増殖効果を示した。この実験は、クリスタルバイオレット染色阻害アッセイを用いて実施された。種々の濃度のFAS 活性を有する細胞を、10%胎牛血清を含むRPMI-1640中で、96ウェルあたり5000細胞で96ウェルプレートに接種した。図面B 5%空気: 5%CO₂雰囲気中で72時間インキュベーションした後、種々の濃度 (0-500 μ g/ml) のTOFA (5-デトラジニルオキシル-2-プロパノール) を加え、培養物を再び48時間インキュベートした。次にプレートを取り出し、記載したようにクリスタルバイオレットにより染色した。それぞれの濃度の試験 ($n=4$)、対照 ($n=8$) およびバックグラウンド ($n=8$) について、吸光度読みを平均した。バックグラウンドの読みを引いた。図15に、TOFAの濃度

餌料野菜	化合物	I.D. (g/ml)
クエン酸リナーゼ	S-カルボキシメチルCOA	61.4
リンゴ酸酵素	プロモビルヘート	52.0
	コシホール	3.1
	N-エチルサリシド	0.9
アセチルCOA	セトキシシム	9.5
カルボキシラーゼ	5-(チトラシルオキシル)-	
	2-プロン酸	4.6

實驗例 16: トリアクソニックとセルレニンの相乗効果

ZR-75-1 細粒を25、000細粒/ウエルで96ウエルマイクロタイタープレートに播種し、5%CO₂中で37℃において一夜(18時間)インキュベートした。トリプシン-Cを加えて、0、2、5、5、0または10、0μg/mlのセルミニンの存在下で次の濃度(マイクロモル)にした:50、25、12、5、6、2、3、1、1、6、0、8、0、4、0、2、0、1および0。それぞれの濃度は4重で実験された。細胞を24時間インキュベートし、PBS

中で洗浄し、1%SDS中で可溶化し、2%エタノール中の0.2%クリスタルバイオレットで染色し、モレキュラダイアグノーシスダイグス (Molecular Diagnostic) プレートリーダーで490nmの読みを測定した。

図16は、トリアシナーGがOA-518_hを発現する腫瘍細胞株(2R-75-1)の細胞の成長を阻害することを示す。セルレニンをそのID₅₀に近いレベルで加えた場合、トリアシナーGのID₅₀は、約15μMから1μM未満に低下し、このことは、これらの2つの阻害剤の組み合わせが相乗効果を奏することを示す。

実施例17：外因性オレエート放出の測定
セルレニンによる増殖阻害からの2R-75-1細胞

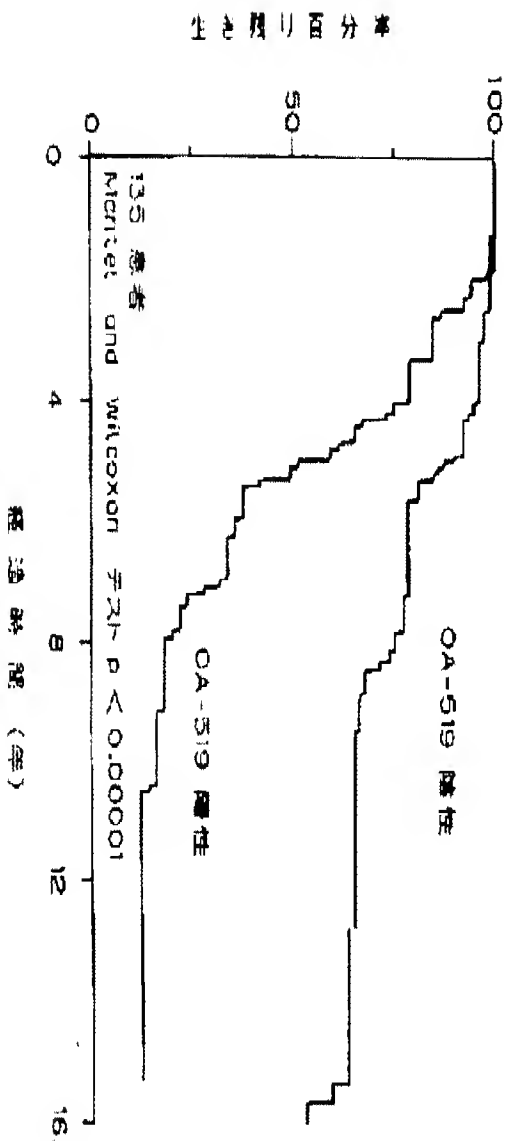
図17は、2R-75-1細胞増殖におけるセルレニン阻害が外因性のオレエートの濃度で可逆性であることを示す。2R-75-1細胞(1ウエルあたり5,000個)を、説明したウシ血清アルブミンに4:1のセル比で結合したオレエート、0.05, 1.0又は1.5mMで補足した増殖の96ウエルマイクロタイタープレート中にプレートした。18時間インキュベートした後、セルレニンを1ドーズ10μM/m1で添加した。24時間(図17、上の線)又は48時間(下の線)後、実施例10と同様にして細胞を染色し分析した。図17の中間の線は、セルレニンなしで各オレエート濃度を含む増殖を24時間目に提供し、全部で48時間インキュベートした後分析した細胞を表す。阻害率は平均の標準誤差を表す。

図17の一番上の曲線では、細胞が0.05, 1.0又は1.5mMのオレエートの存在下で24時間10μM/m1のセルレニンに暴露された場合、オレエートの1.5mM濃度はセルレニンによる増殖阻害について事実上完全に逆転させた。48時間細胞をインキュベートすると、一貫低い曲線により示されている通り阻害が起きた。この曲線はオレエートによる逆転はなかった。48時間で見られた抗増殖活性が増殖中のオレエートの枯渇によるとすると、24時間目と同じ各オレエート濃度を含む新鮮な増殖(追加のセルレニンは含有

内容に変更なし

FIG. 1

乳癌のOA-519(FAS)発現及び生き残り



しない)を細胞に提供すると細胞を救うであろう。中間の曲線は24時間目に細胞に提供したときこの効果を示すが、事実1.5μMオレエートだ48時間後細胞を救った。オレエートが存在しないとき、両供給と両供給しない細胞は、両方のセルレニン種介増殖阻害を示した。

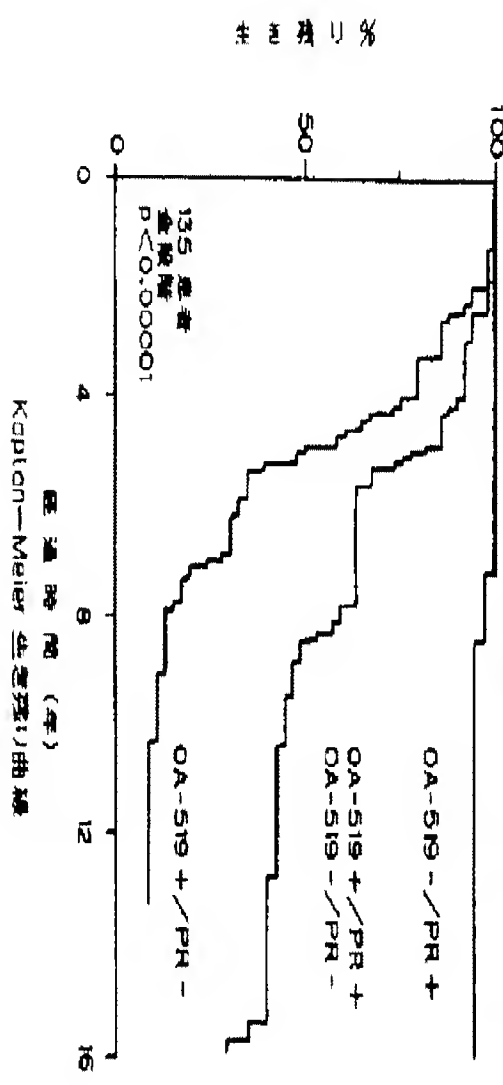
実験は、セルレニンの抗増殖活性からの放出が追加の細胞死によるものであり、増殖中に存在する増殖因子のようなグルコースや他の物質によるものでなかったことを示す。興味のあることに、SW-480や正常ヒトフアイブラストのような低FAS活性をもつ細胞系は、より低い(0.5mM)、生理学的濃度のオレエートを要求し、セルレニン増殖阻害からの放出を達成した(実施例5参照)。2R-75-1細胞(1.5mM)を救うのに必要はオレエートの量は経生理学的量であり、この量は高脂肪的細胞系を含む食物により達成できると思われる。これらのブローカーを合わせると、セルレニンは細胞の死をもたらす脂肪酸欠乏の状態を作り出すことにより作用することを示唆しており、これは内因性脂肪酸合成の量に比例する。

本発明を特定の発癌細胞に結び付けて説明したが、前述の詳細な説明及び実施例は例証のためであり本発明の範囲を限定するものでないことが了解されよう。他の増殖、利点及び修正は本発明に開示する当業者に明らかであり、これらの増殖及び修正は本発明の範囲内であり、添付の請求の範囲によってのみ限定される。

内容に変更なし

FIG. 1A

OA-519及びブロードスプロン受容体の免疫組織学的検出は乳癌患者に対して予後的判定に役立つ



0.7N(14番に変更なし)

FIG. 2A

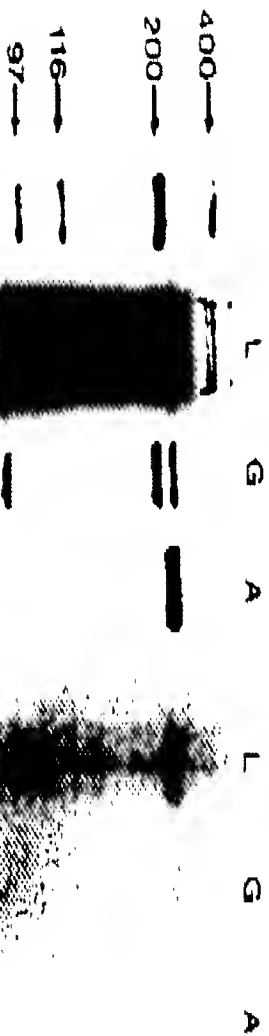
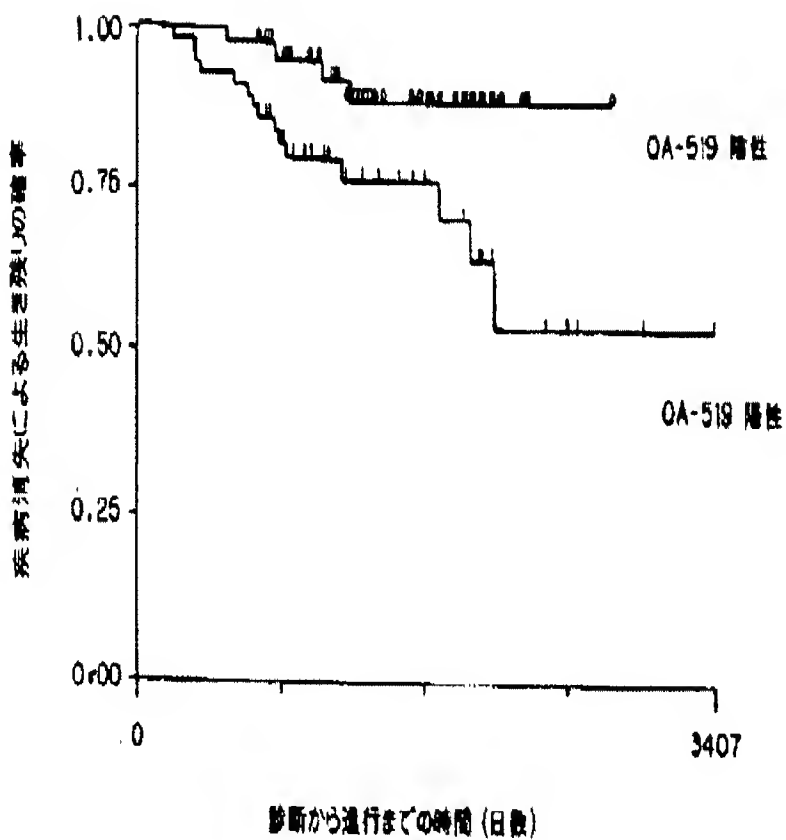
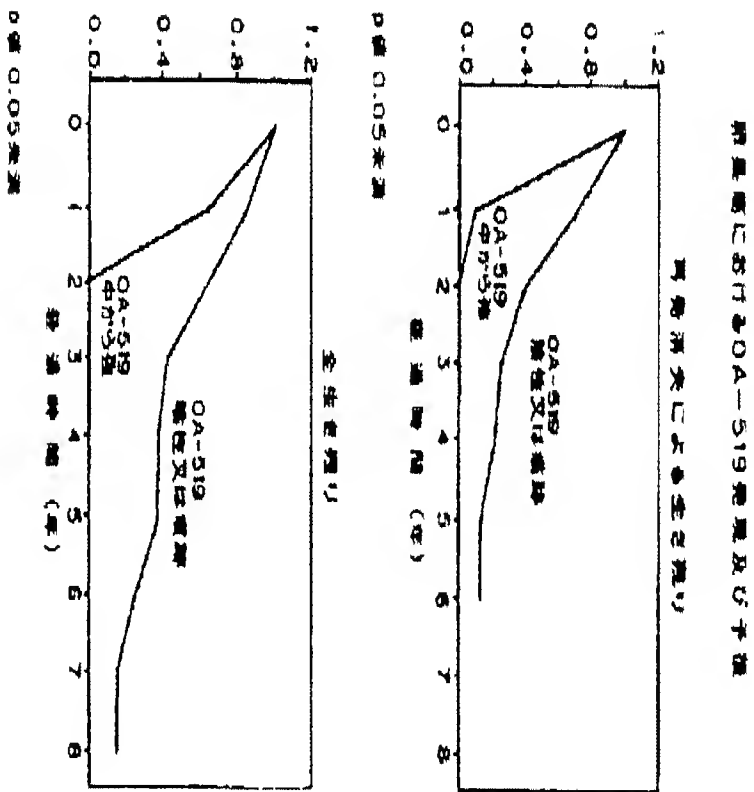


FIG. 2C

0.7N(14番に変更なし)

FIG. 2B



0.7N(14番に変更なし)

FIG. 3A

OA-519と免疫学的に交差反応性のペプチドの34アミノ酸配列

Leu Tyr Ser Gly Asn Asp Val Thr Asp Ile Ser Asp Asp Arg Phe Pro Lys Pro Pro Glu Ile Ala Asn Gly Tyr
Val Glu Lys Leu Phe Arg Tyr Gln Cys.

FIG. 38

OA-519ペプチド配列分析

配列 1 : 134kD OA-519ペプチド配列相同の分析

0A-519ペプチド配列: LQQHDVADGEQWXP
|||:|||:

ラット脂肪酸シンターゼ (EC 2.3.1.85): TKLQGHDAAGQGWDPSPAPTNLGALD
1290 1300

重合した13個のアミノ酸のうち84.6%同一

配列 2 : 1991年7月26日に出版した一部継続出版(米特許出願番号 07/735522号)の实施例 12からのOA-519ペプチド配列の分析

0A-519ベプチド配列: HAVYLE
|||||
ラット腎臓膜シンターゼ (EC 2.3.1.85): HAVYLE

重複した6種のアミノ酸のうち100%同一

FIG. 4

OA-519はアセチル-及びマロニル-CoAから脂肪酸を合成

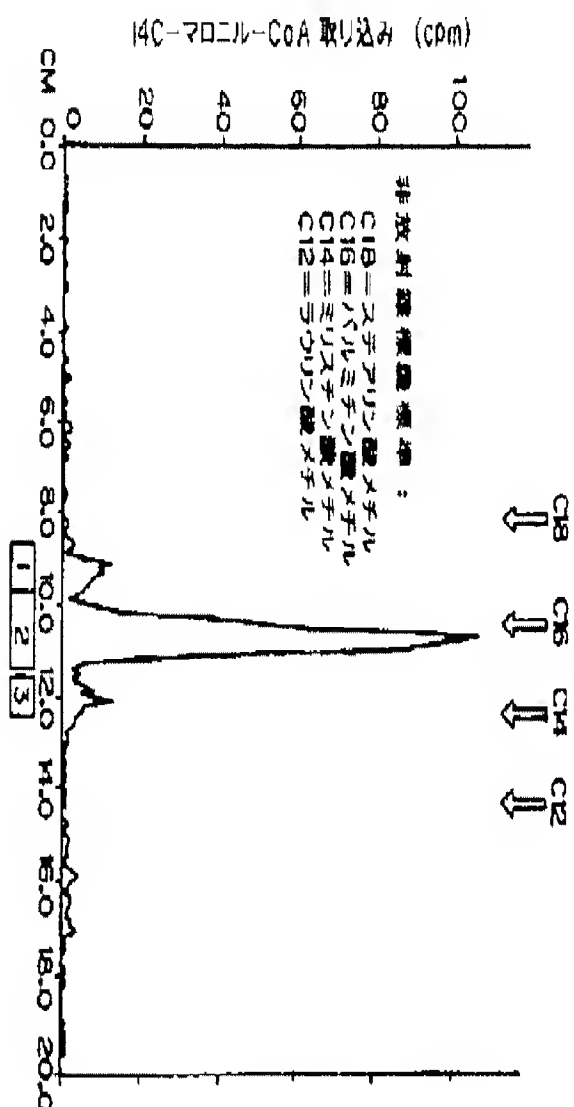
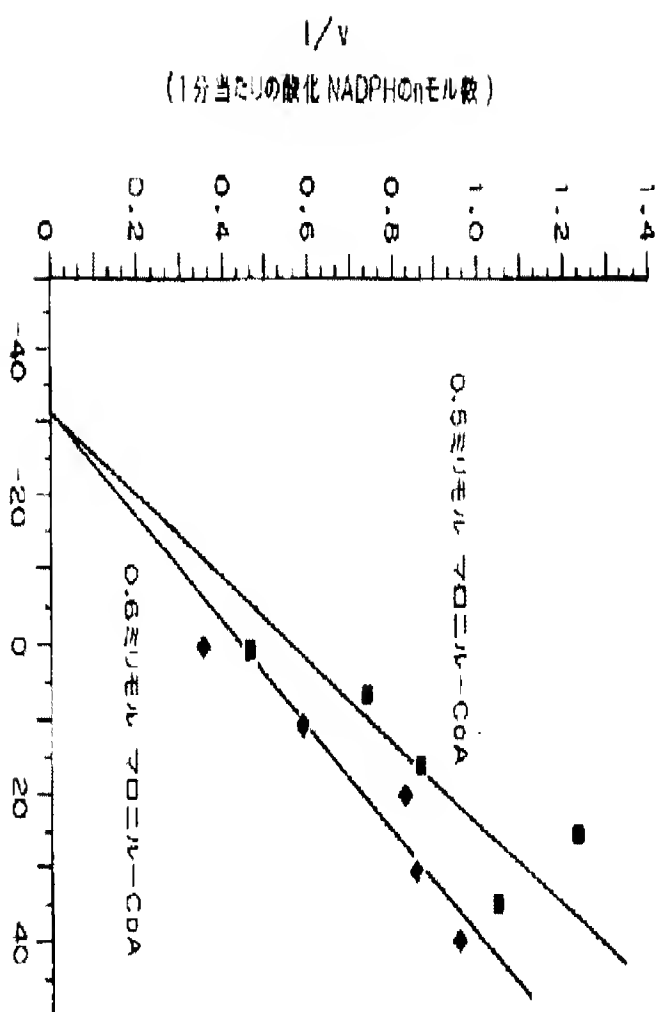


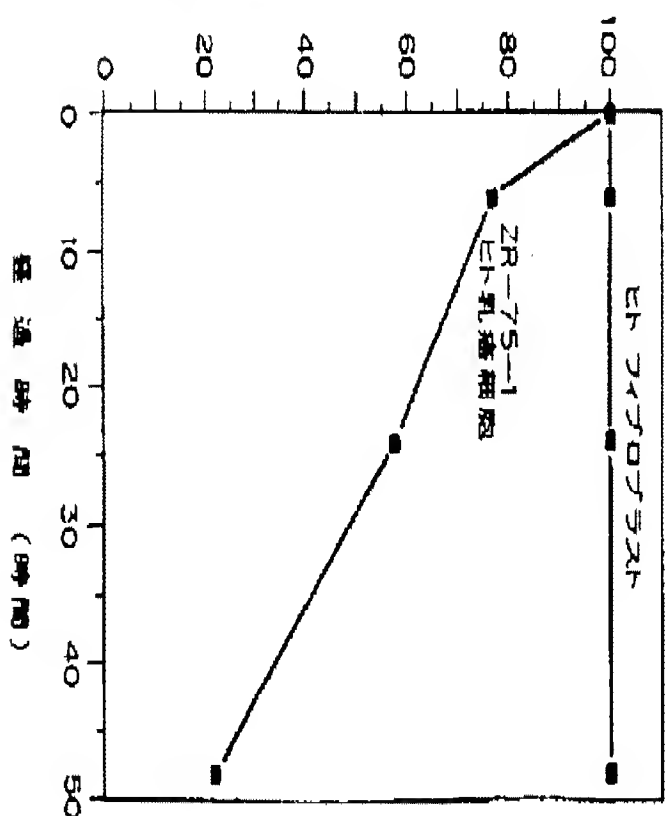
FIG. 5

OA-519 脂肪酸シンターゼ活性のセルレニン阻害のDixonプロット



特許(内容に変更なし)
FIG. 6

細胞増殖 (コントロールの%)



ZR-75-1

DU-4475



FIG. 9

FIG. 7

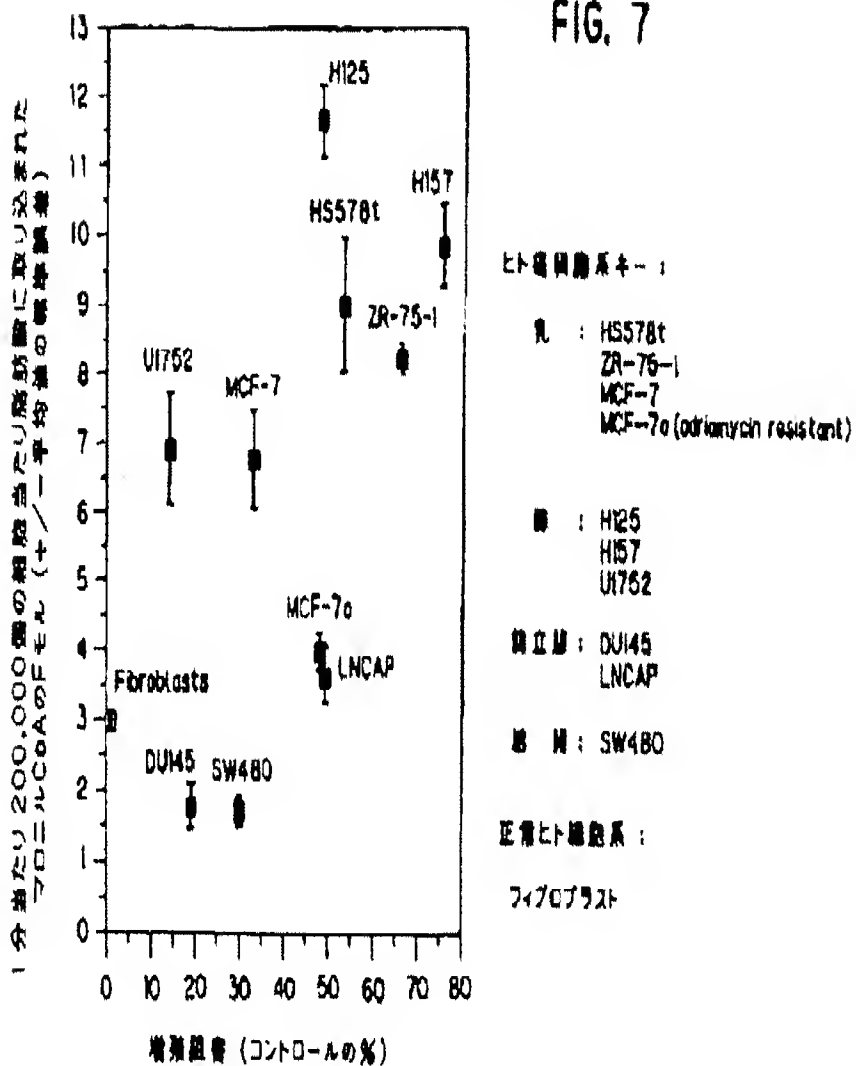


FIG. 8

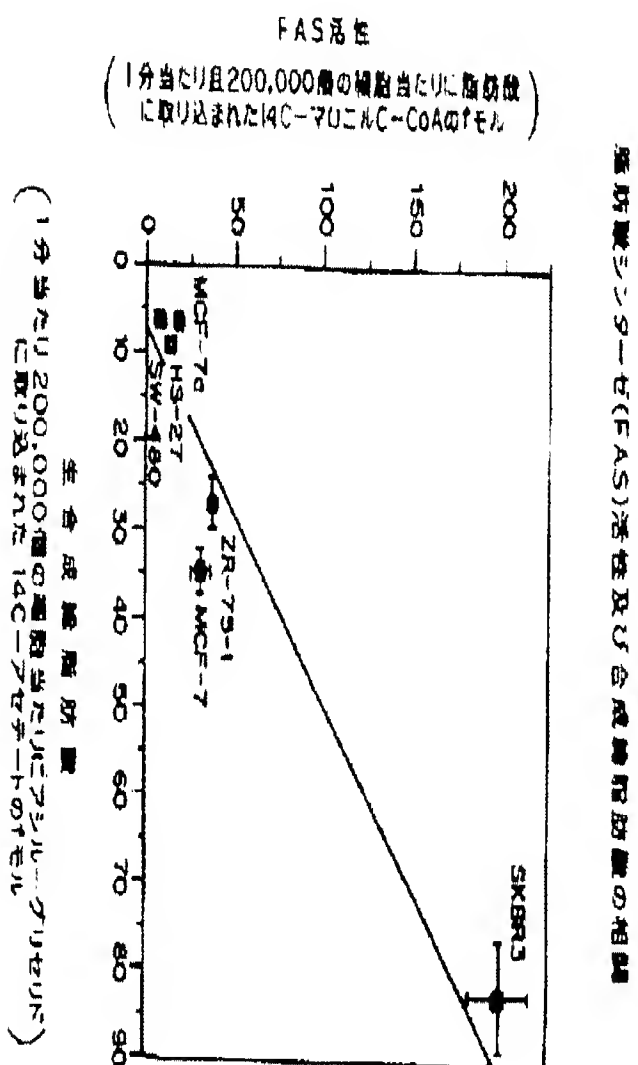
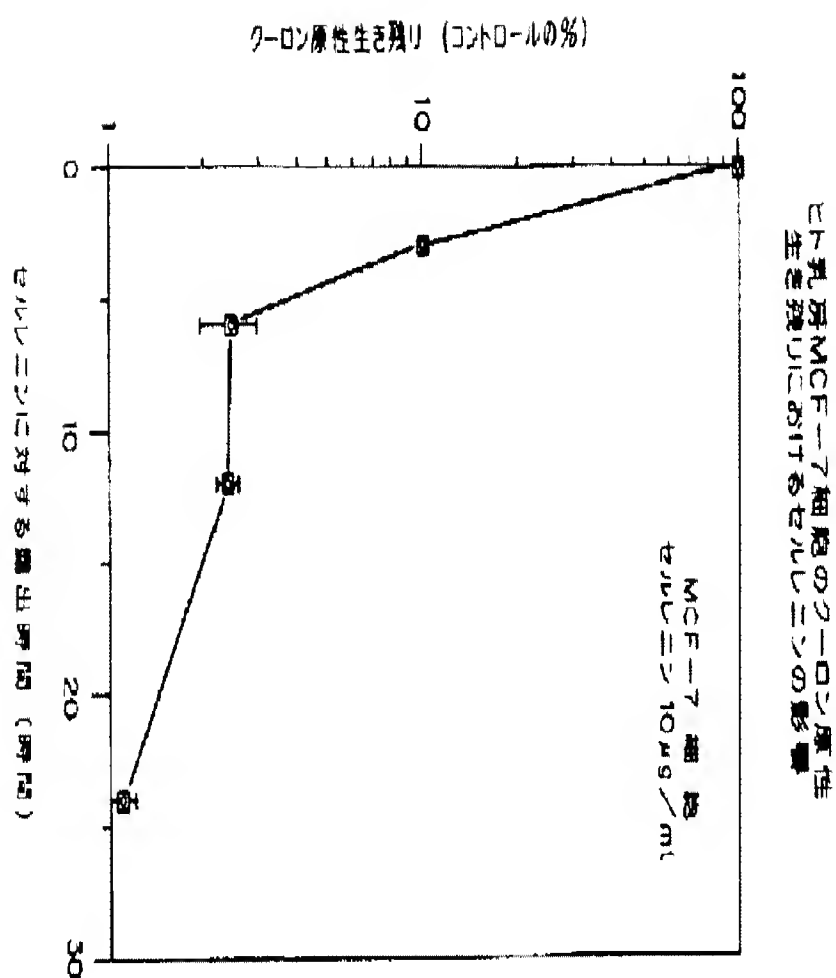


FIG. 10

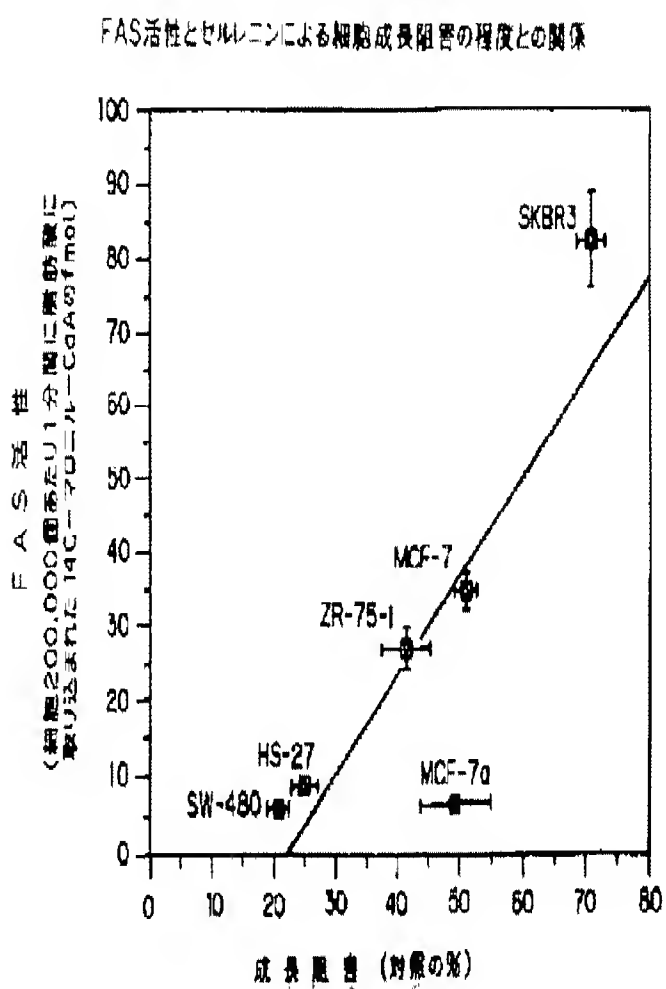


内容(内容に変更なし)
FIG. 11A

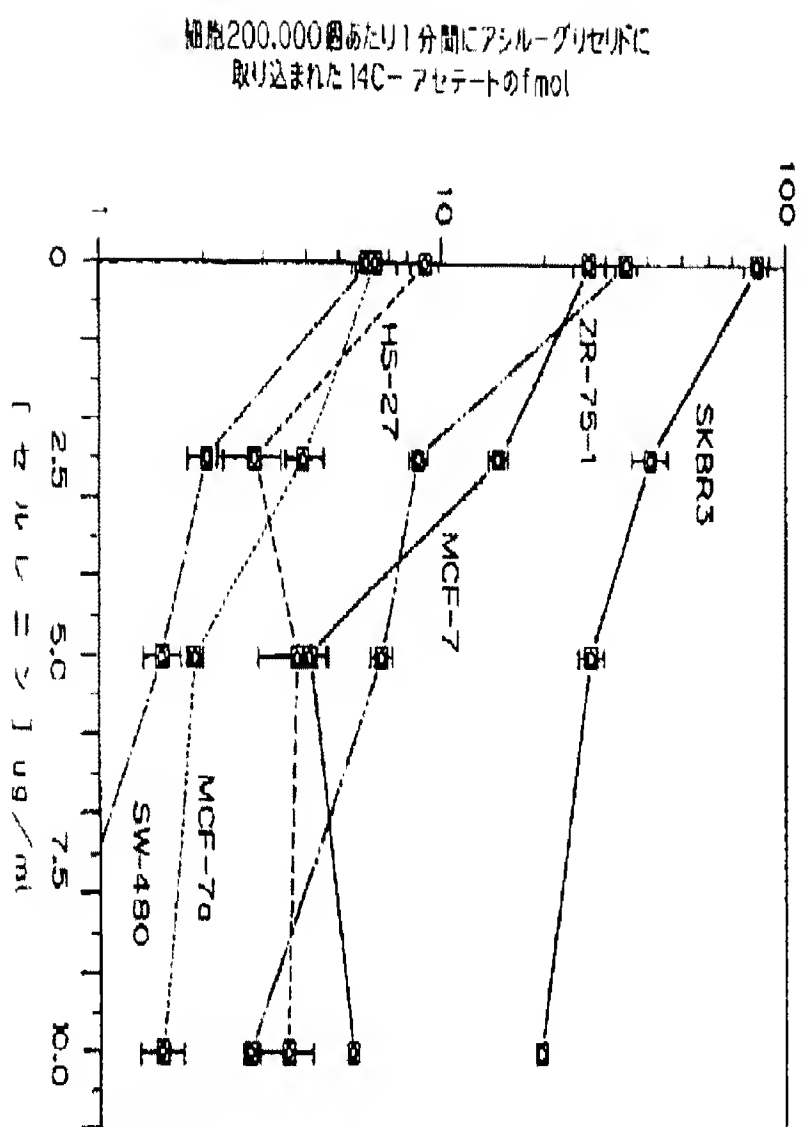


内容(内容に変更なし)

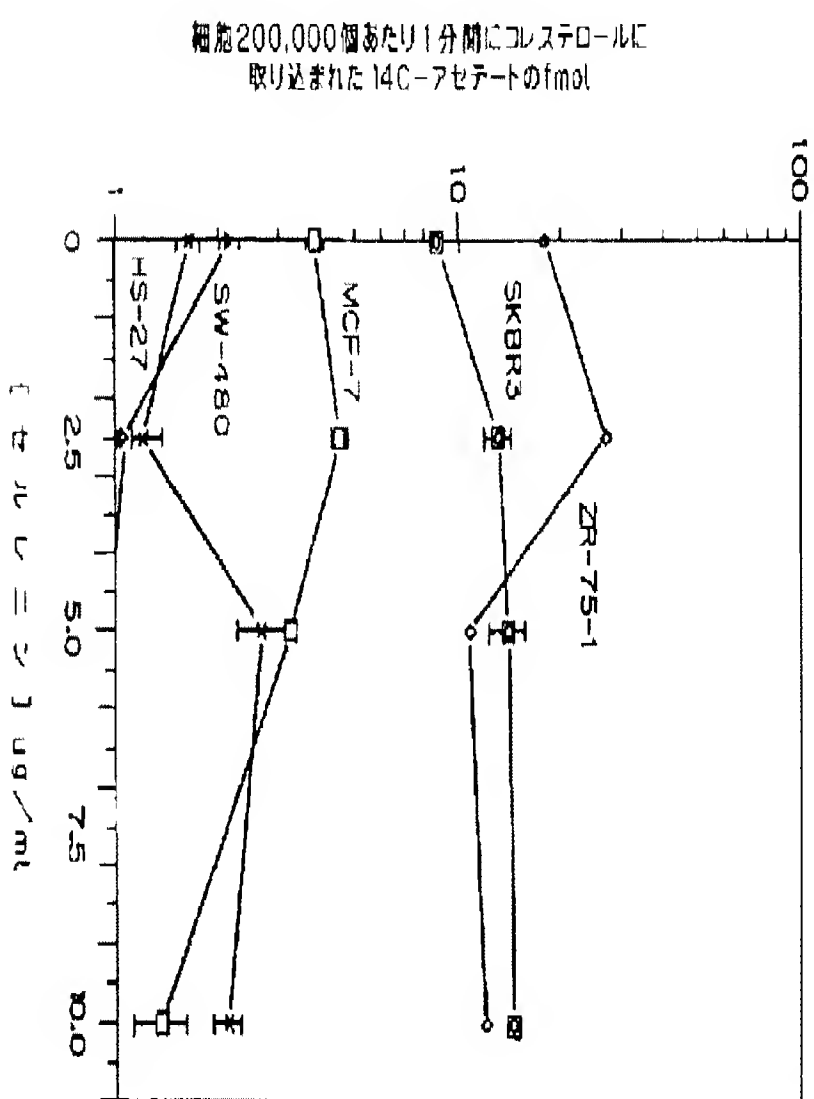
FIG. 11B



内容(内容に変更なし)
FIG. 12A



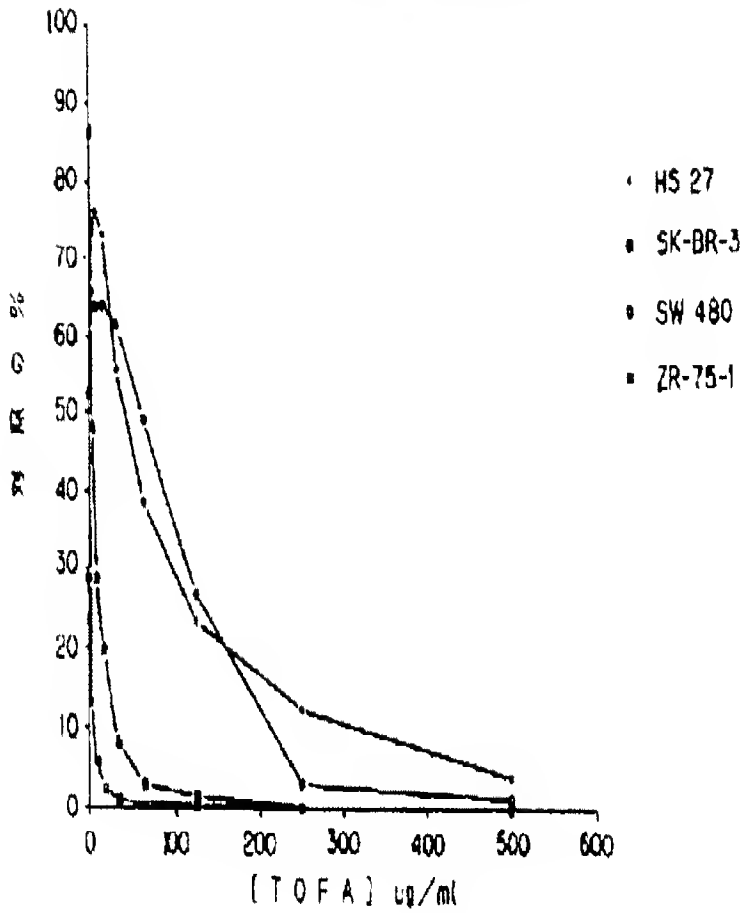
内容(内容に変更なし)
FIG. 12B



※(内容に変更なし)

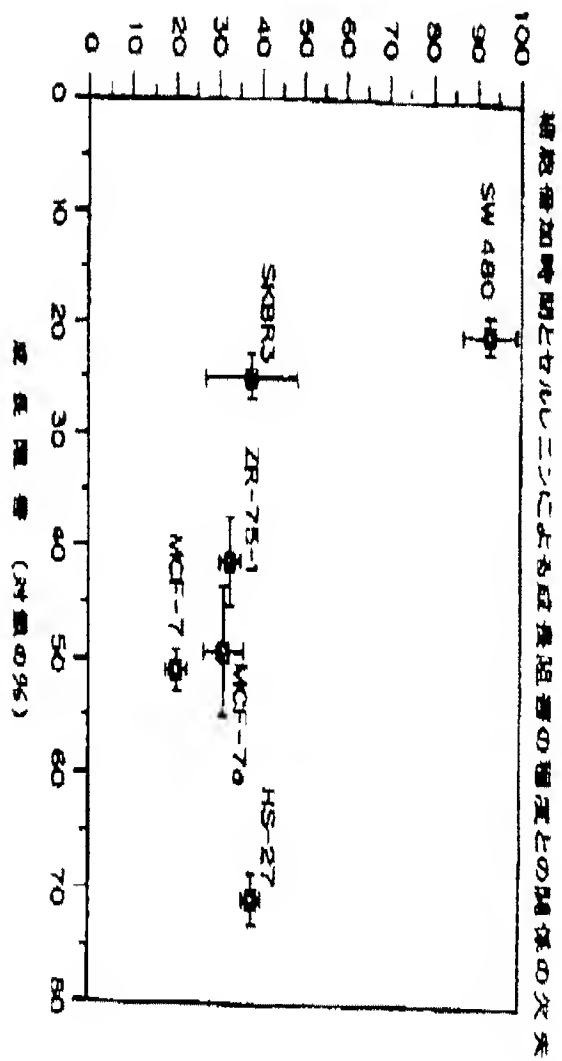
FIG. 15

TOFAによる成長阻害の効力



※(内容に変更なし)

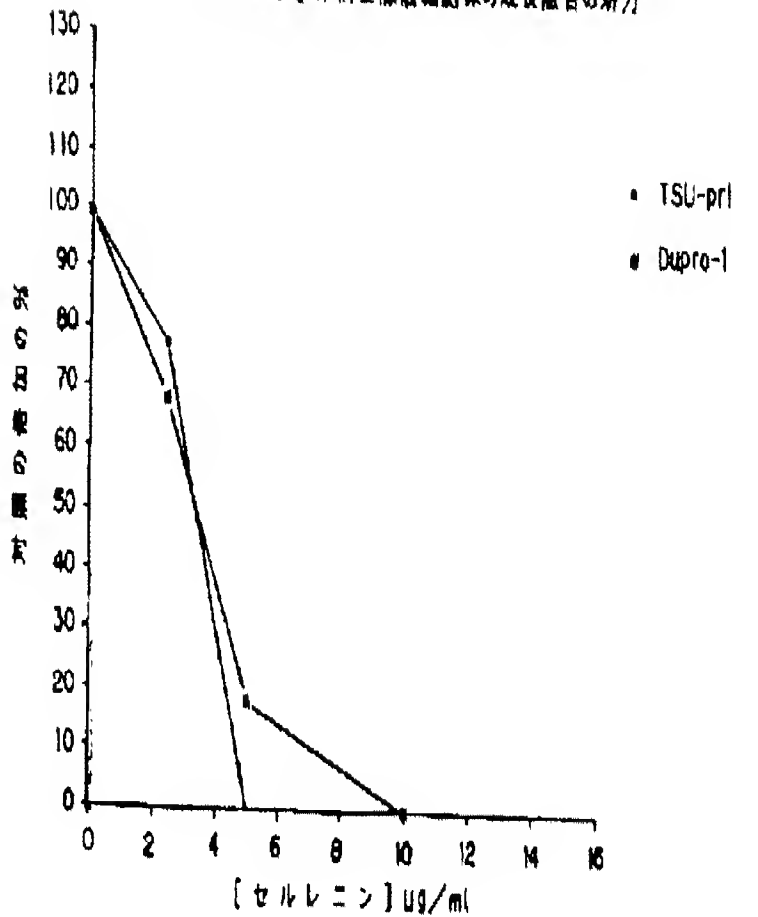
FIG. 13



※(内容に変更なし)

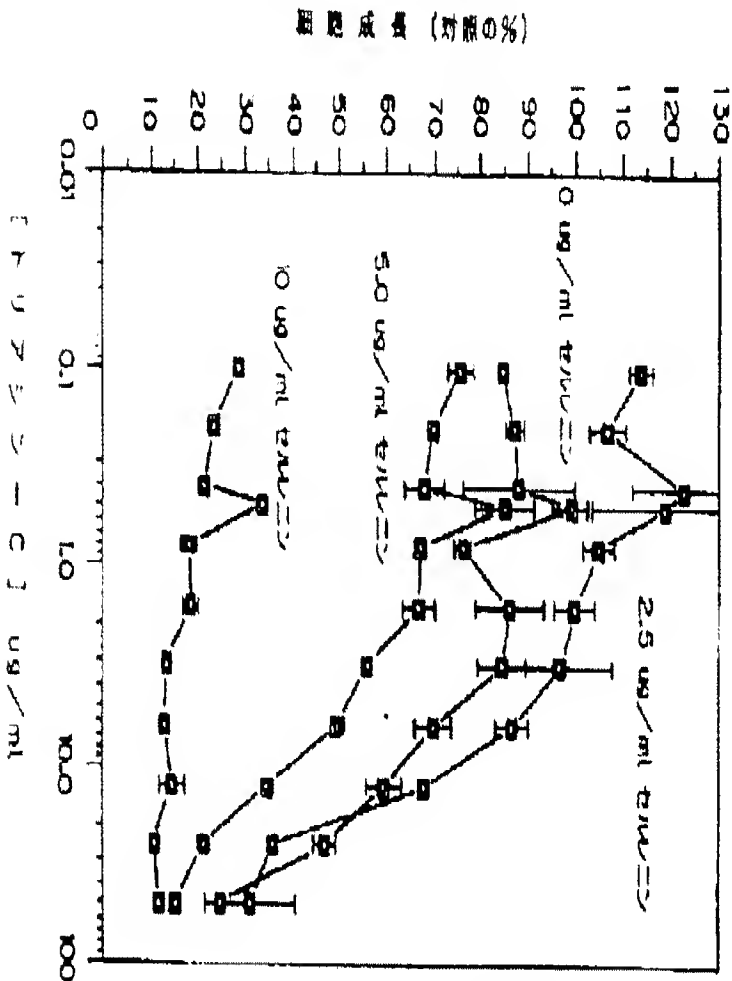
FIG. 14

セレンによるヒト乳がん細胞株の成長阻害の効力



※(内容に変更なし)

FIG. 16



特許庁長官 高 橋 家 政

1. 事件の表示

PCT/US93/07023
平成6年特許第504755号

2. 発明の名称

がんの治療に脂肪酸合成阻害剤を用いる方法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住 所 名 称 サ・ジョーンズ・ホスピス・ユニバーシティ

4. 代理人

住 所 東京都千代田区大手町二丁目2番1号

新大手町ビル 206号

氏 名 (2770) 弁護士 湯 浅 恭 三

5. 補正の対象

- (1) 出願人の代表者名を記載した国内書面
- (2) 委任状及び翻訳文
- (3) サイテ印書により押書した明細書、請求の範囲及び要約書の翻訳文
- (4) 図面翻訳文

6. 補正の内容

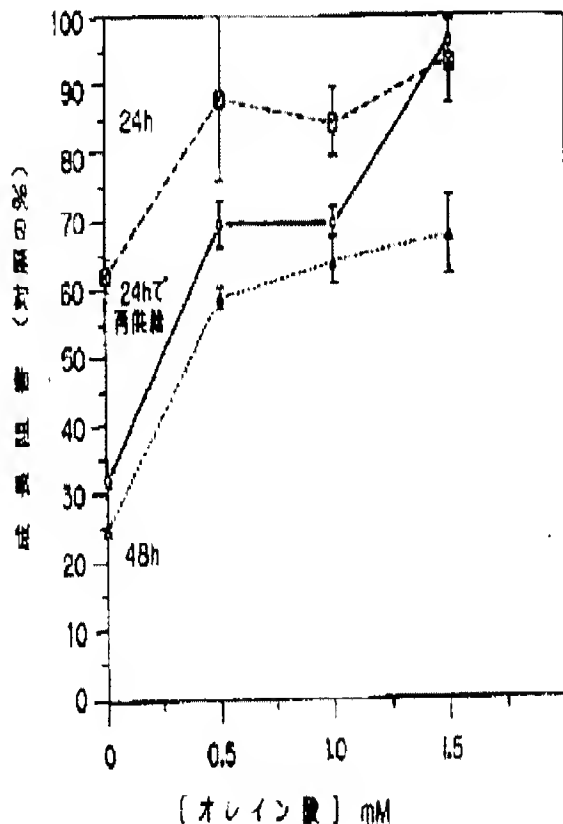
別紙の通り (前、上段(1)(4)の書面の内容には変更なし)

特 許 庁
- 7, 4, - 6
図面係課

特許(内容に変更なし)

FIG. 17

外因性オレイン酸によるセルレニン成長阻害からの乳癌ZR-75-1細胞の救出



特 許 補 正 書

PCT/US 93/07023

IPC 5 ABLE

IPC 5 ABLE

IPC 5 ABLE

IPC 5 ABLE

IPC 5 ABLE

IPC 5 ABLE

IPC 5 ABLE

IPC 5 ABLE

IPC 5 ABLE

IPC 5 ABLE

IPC 5 ABLE

IPC 5 ABLE

IPC 5 ABLE

IPC 5 ABLE

IPC 5 ABLE

IPC 5 ABLE

IPC 5 ABLE

IPC 5 ABLE

特 許 補 正 書

PCT/US 93/07023

IPC 5 ABLE

IPC 5 ABLE

IPC 5 ABLE

IPC 5 ABLE

IPC 5 ABLE

IPC 5 ABLE

IPC 5 ABLE

IPC 5 ABLE

IPC 5 ABLE

IPC 5 ABLE

IPC 5 ABLE

IPC 5 ABLE

IPC 5 ABLE

IPC 5 ABLE

IPC 5 ABLE

IPC 5 ABLE

IPC 5 ABLE

IPC 5 ABLE

Category	Source of material, with reference, other appropriate, if not previous paragraph	Approved or Admin. Use
X	CANCER CHEMISTRY. PAPERBOOK. vol. 14. 1965 1. Theobaldus. 17. Growth of leukemic cells by inhibition of chemodectoma; phenolacetamide and methylol. 1965 column. 1965 25 - 1965 column. 1965 2 see page 205. 1965 column. 1965 1 - 1965 6	1-62
X	ADON-DE PAPERBOOK. 1. THEOBALD. vol. 11. no. 1. 1977 1. Theobaldus. 17. Growth of leukemic cells by inhibition of chemodectoma; phenolacetamide and methylol. 1965 column. 1965 25 - 1965 column. 1965 2 see page 205. 1965 column. 1965 1 - 1965 6	1-62
X	US.A. 4. 320. 196. (GOLD) 4 May 1962 see entry 1	1-62
X	J. BACTERIOLOGY. vol. 39. no. 1. 1968 pages 25 - 6 Effects of some antibiotic agents on growth and glycolytic enzymes of the <i>Escherichia coli</i> strains. see p. 25. tab. 2. (References)	1-62
X	NEW ENGLAND JOURNAL. vol. 8. no. 2. 1971 pages 117 - 12 Inhibition of leukemic cells by inhibition of chemodectoma; phenolacetamide and methylol. 1965 column. 1965 25 - 1965 column. 1965 2 see page 205. 1965 column. 1965 1 - 1965 6	1-62

[illegible]

Project description and no. activity report	Publication date	Classification category	Publication date
00-A-250616		None	
EP-A-0206734	25-11-83	AU-0- 508012 22-03-80 AU-A- 7810387 25-09-82 CA-A- 1280787 06-08-81 JP-A- 62720423 05-10-87 US-A- 5128152 07-07-82 US-A- 5146726 21-06-88	
US-A-8338246	04-06-82	None	

(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CZ, DE, DK, ES, FI, GB, HU, JP, KP, KR, KZ, LK, LU, MG, MN, MW, NL, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SK, UA, VN

PCT

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION
International Bureau



INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification 5 : A61K 31/00, 31/335, 31/20, 31/23, 31/34	A1	(11) International Publication Number: WO 94/02108
		(43) International Publication Date: 3 February 1994 (03.02.94)

(21) International Application Number: PCT/US93/07023	(81) Designated States: AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CZ, DE, DK, ES, FI, GB, HU, JP, KP, KR, KZ, LK, LU, MG, MN, MW, NL, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SK, UA, VN, European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
(22) International Filing Date: 26 July 1993 (26.07.93)	
(30) Priority data: 917,716 24 July 1992 (24.07.92) US	

(71) Applicant: THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY [US/US]; 720 Rutland Avenue, Baltimore, MD 21205 (US).
(72) Inventors: KUHAIDA, Francis, P.; 5409 St. Albans Way, Baltimore, MD 21212 (US). PASTERNAK, Gary, R.; 311 Edgevale Road, Baltimore, MD 21210 (US).
(74) Agents: HOSCHKEIT, Dale, H. et al.; Banner, Birch, McKie & Beckett, 1001 G Street, N.W., 11th Floor, Washington, DC 20001 (US).

Published
*With international search report.
Before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of the receipt of amendments.*

(54) Title: USE OF INHIBITORS OF FATTY ACID SYNTHESIS FOR TREATING CANCER

(57) Abstract

Fatty acid synthase (FAS) is overexpressed in carcinomas with poor prognosis, but little FAS expression is identified in normal tissues. Inhibition of fatty acid synthesis is selectively toxic to carcinoma cells, while normal cells with low FAS activity are resistant. This invention provides a method of treating cancer patients where fatty acid synthesis by cells of the patient's tumor is inhibited with resultant interruption of the disease process.